

Санкт-Петербургский Государственный университет

Кисель Элана Вадимовна

Использование технологии CRISPR/Cas9 для получения мутантов по
генам транспортеров серотонина у *Danio rerio*

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки 06.04.01 Биология

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Научный руководитель:

ст.н.с., проф., д.б.н. Людмила Андреевна Мамон

Научный консультант:

н.с. Лаборатории биологической психиатрии
ИТБМ Дарья Андреевна Мешалкина

Санкт-Петербург

2018

Содержание

Список условных обозначений и сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы	8
1.1. <i>Danio rerio</i> как модельный объект для генетических манипуляций	8
1.2. Система CRISPR/Cas9 как технология редактирования геномов	11
1.3. Транспортёры серотонина у человека и других млекопитающих	17
1.4. Транспортёры серотонина у <i>Danio rerio</i>	19
2. Материалы и методы	22
2.1. Праймеры	22
2.2. Среда и растворы, использованные в работе	22
2.3. Методы работы с бактериями и плазмидами	23
2.3.1. Приготовление химически компетентных <i>Escherichia coli</i>	23
2.3.2. Трансформация бактерий <i>Escherichia coli</i>	24
2.3.3. Выделение плазмид из культур <i>E. coli</i>	24
2.4. Создание плазмидных векторов для технологии CRISPR/Cas9	25
2.4.1. Дизайн олигонуклеотидов для CRISPR/Cas9	25
2.4.2. Конструирование плазмид для технологии CRISPR/Cas9	27
2.4.3. Валидация векторов для CRISPR/Cas9 при помощи ПЦР и секвенирования	28
2.5. Методы работы с <i>Danio rerio</i>	29
2.5.1. Условия содержания рыб	29
2.5.2. Скрещивание <i>D. rerio</i>	29
2.5.3. Проведение микроинъекций	29
2.6. Методы, использованные для генотипирования особей	30
2.6.1. Получение образцов тканей (хвостовых плавников) и выделение из них	

геномной ДНК	30
2.6.2. Генотипирование особей при помощи полимеразной цепной реакции	30
2.6.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	32
2.6.4. Подготовка к секвенированию участков генов интереса	32
2.7. Методы работы с РНК	35
2.7.1. Транскрипция РНК-гидов <i>in vitro</i>	35
2.7.2. Денатурирующий электрофорез РНК в агарозном геле	35
3. Результаты	37
3.1. Конструирование плазмид для технологии CRISPR/Cas9	37
3.2. Микроинъекции плазмидной ДНК в икру <i>Danio rerio</i>	42
3.3. Генотипирование особей <i>Danio rerio</i> при помощи методов полимеразной цепной реакции и секвенирования ДНК	43
3.4. Работа с РНК	47
Обсуждение	49
Выводы	53
Благодарности	54
Список использованной литературы	55

Список условных обозначений и сокращений

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

Cas – ассоциированные с CRISPR элементы (CRISPR associated)

PAM – смежный с протоспейсером мотив (protospacer adjacent motif)

мРНК – матричная РНК

МО – морфолиновый олигомер

Pipes – пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота)

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

MOPS – 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота

DEPC – диэтилпирокарбонат

OD – оптическая плотность

EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок (enhanced green fluorescent protein)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

тыс. п.н. – тысяч пар нуклеотидов

п.н. – пар нуклеотидов

М – маркерная ДНК

WT – дикий тип

тРНК – транспортная РНК

Введение

Технология CRISPR/Cas9 – новейший метод редактирования геномов, основанный на особом адаптивном иммунитете прокариот. В общем случае для её применения необходимы лишь РНК-гид и нуклеаза Cas9, вносящая в ДНК двунитевые разрывы. Последовательность РНК-гида включает участок, соответствующий выбранной в геноме последовательности мишени, и шпильку, необходимую для образования комплекса с нуклеазой, благодаря которым он направляет активность Cas9 на мишень. Два эти элемента в том или ином виде (плазмидные векторы для экспрессии, РНК-гид и мРНК Cas9, РНК-гид и белок Cas9) вносят в клетки, геном которых хотят изменить. Двунитевой разрыв затем репарируется одним из двух путей: негомологичным объединением концов (вследствие этого образуются короткие делеции или инсерции) или гомологичной рекомбинацией с матрицей, либо имеющейся в клетке исходно, либо привнесенной в ходе опыта.

При помощи технологии CRISPR/Cas9 можно решать разнообразные задачи: получение точечных мутаций, делеции небольших участков и даже крупных фрагментов хромосом, внесение необходимых последовательностей в заранее определенное место генома, активация и подавление транскрипции генов и т.д. Ведутся работы по изучению возможности использования технологии CRISPR/Cas9 в терапевтических целях. Эта технология показала эффективность на широком спектре организмов, позволяя получать мутантные линии животных, растений и штаммы грибов за очень короткий срок.

В данной работе мы рассматриваем эффективность использования инъекций плазмидных векторов, содержащих последовательности для синтеза РНК-гидов и нуклеазы Cas9 под контролем сильных эукариотических промоторов, для внесения изменений в геном рыб *Danio rerio*.

Обычно плазмидные векторы используют для трансфекции клеточных культур, однако подобная система показала высокую эффективность для мыши *Mus musculus* (до 50% мутантных особей, в том числе гомозиготы) (Mashiko, Fujihara et al., 2013; Mashiko, Young et al., 2014), а также на *Drosophila melanogaster* – организме со столь же высокой скоростью дробления зиготы, как и у данио (5-25% мутантов, мутации в клетках зародышевой линии на уровне 1%) (Gratz, Cummings et al., 2013). Однако на данио плазмидные векторы такого типа впервые применены в данной работе.

Этот метод является более дешевым и простым, чем работа с РНК. Его оптимизация для использования и в других организмах (например, у *D. rerio*) может сделать эту технологию редактирования генома ещё более доступной и удобной.

Из всего перечня возможных модификаций мы решили остановиться на получении делеций протяженных участков выбранных генов по схеме, предлагающей использование двух РНК-гидов для одного гена – с мишенями в начале и в конце делетируемого участка (Kato, Hara et al., 2017; Wang, Geng et al., 2017).

В последнее время небольшая тропическая рыба *Danio rerio* стала популярным модельным объектом не только в биологии развития и генетике, но и начала играть большую роль в исследовании физиологии мозга и психических расстройств человека. Исходя из высокой генетической гомологии с человеком, удобства манипуляций с эмбрионами, простоты и дешевизны содержания, эти рыбы всё чаще становятся объектом исследований нейронаук и вовлекаются в скрининг психотропных препаратов (Gerlai, 2013; Stewart, Gerlai et al., 2015; Stewart, Grieco et al., 2015).

При общем генетическом сходстве с млекопитающими, данио и другие представители *Teleostei* имеют и ряд ключевых отличий. Так, предок всех костистых рыб претерпел дополнительный раунд дупликации всего генома, что вызвало появление генов, кодирующих белки со сходными функциональными ролями, в том числе и участников систем передачи сигналов в мозге (Meyer and Malaga-Trillo, 1999), среди которых есть и два транспортера серотонина.

Понимание того, существуют ли различия между функциями подобных белков у данио, немаловажно и при тестировании на этих рыбах психотропных препаратов. Например, для разработки ингибиторов обратного захвата серотонина, применяющихся при депрессии, важно, за какие из детектируемых эффектов отвечает каждый из транспортеров (например, снижение уровня тревожности при воздействии препарата (Abreu, Koakoski et al., 2014; Egan, Bergner et al., 2009)).

Данные транспортеры имеют различную локализацию в мозге, что должно сопровождаться и функциональной специализацией. Изучение различий функций двух этих транспортеров на уровне характеристики поведенческого фенотипа ранее не проводили, несмотря на наличие некоторых мутантных (полученных в ходе ненаправленного мутагенеза и имеющих однонуклеотидные замены в данных генах) форм в банках генетических линий *D. rerio*. Этими фактами и обусловлен выбор генов, функции которых мы хотели бы изменить.

Целью данной работы было получить и опробовать плазмидные векторы, используемые в технологии CPISPR/Cas9, для получения особей *Danio rerio*, мутантных по генам транспортеров серотонина.

Для достижения этой цели был поставлен ряд **задач**:

1. Ознакомиться с методикой подбора последовательностей мишеней для системы CPISPR/Cas9 и выбрать по 2 мишени для каждого из двух выбранных генов.
2. Получить плазмиды, используемые в технологии CPISPR/Cas9, необходимые для синтеза РНК-гидов и содержащие ген *cas9* под контролем эукариотического промотора
3. Освоить метод микроинъекций в эмбрионы данио на ранних этапах развития.
4. Подобрать методику отбора мутантных особей и освоить методы, необходимые для проведения отбора. Произвести анализ полученных после микроинъекций особей.

1. Обзор литературы

1.1. *Danio rerio* как модельный объект для генетических манипуляций

Danio rerio – небольшая пресноводная тропическая рыба (до 4 см в длину), относящаяся к семейству *Cyprinidae* (Mayden, Tang et al., 2007). Эти костистые рыбы являются типичными обитателями небольших рек юго-востока Гималай, Индии, Пакистана, Бангладеш, Непала и Бирмы, где они обычно обитают в ручьях, каналах, прудах и различных водных объектах со слабым течением, например, на рисовых полях (Spence, Gerlach et al., 2008).

Приблизительное время генерации у данио составляет 3-4 месяца, а самки могут метать икру каждые 2-3 дня, производя до 200 икринок в каждой кладке (Nasiadka, 2012). Икра относительно крупная (1,2 мм в диаметре), а эмбрионы оптически прозрачны в первые дни развития, что позволяет легко производить над ними различные манипуляции (Spence, Gerlach et al., 2008). *Danio rerio* также являются социальными животными и живут в косяках (Green, Collins et al., 2012; Miller and Gerlai, 2007) и – так же, как и люди – являются дневным видом, следовательно более активно реагирующим на зрительные стимулы, нежели на обонятельные (как, например, грызуны) (Menger, Koke et al., 2005).

Быстрое воспроизводство, относительно высокая генетическая гомология с человеком и низкая стоимость содержания сделали данио удобным и экономичным инструментом для генетики, эмбриологии, нейрофизиологии и высокопроизводительного скрининга эффективности препаратов (Gerlai, 2013; Stewart, Gerlai et al., 2015; Stewart, Grieco et al., 2015) или определения токсичности веществ (Ellis, Soo et al., 2014; Hill, Teraoka et al., 2005; Panzica-Kelly, Zhang et al., 2012).

Зебраданио также представляет собой перспективную модель для изучения тревожных расстройств человека (Clark, Boczek et al., 2011; Egan, Bergner et al., 2009; Pavlidis, Theodoridi et al., 2015; Steenbergen, Richardson et al., 2011) из-за удобства изучения их форм поведения, связанных с тревожностью, и сходства с эндокринным ответом организма человека на стрессорное воздействие (например, у рыб и человека ключевым гормоном стресса является кортизол, а не кортикостерон, являющийся таковым у грызунов) (Abreu, Koakoski et al., 2014; Alsop and Vijayan, 2008).

Высококачественный референсный геном зебраданио был опубликован в журнале «Nature» в 2013 году. Он обладает значительной степенью сходства с геномами других видов позвоночных. Так, для 71,4% генов человека у данио есть хотя бы один ортолог

(Howe, Clark et al., 2013; Postlethwait, Woods et al., 2000). Если сравнивать геном зебраданио с человеческим, многие его регионы претерпели инверсии и транслокации, а некоторые были дублированы.

По сравнению с другими видами позвоночных, предок данио также претерпел дополнительный раунд дубликации всего генома (whole-genome duplication, WGD), называемый дубликацией генома, специфичной для костистых рыб (*Teleostei*) (*Teleostei* specific duplication, TSD) (Meyer and Malaga-Trillo, 1999). Это привело, например, к появлению большего количества генов рецепторов нейромедиаторов, 2-х вариантов транспортеров серотонина (Wang, Takai et al., 2006), 3-х форм триптофан гидроксилазы (Ren, Li et al., 2013)) или 2-х копий гена белка предшественника амилоида (т. е. генов *appa* и *apbb*) (Musa, Lehrach et al., 2001).

Danio rerio активно используется в генетике начиная с 1980-х годов и является достаточно хорошо охарактеризованным модельным объектом. В 1981 году Стрейсингер с коллегами произвели клонирование зебраданио, и, таким образом, эта рыба стала одним из первых клонированных позвоночных (Streisinger, Walker et al., 1981).

В 1996 году *Danio rerio* стал объектом крупномасштабного случайного мутагенеза, проведенного для идентификации генов, участвующих в раннем развитии позвоночных (Driever, Solnica-Krezel et al., 1996; Haffter and Nusslein-Volhard, 1996). Эти исследования основывались на использовании химических мутагенов, за применением которых следуют отбор и характеристика особей с интересующими фенотипами (Patton and Zon, 2001). Однако, использование метода случайного мутагенеза имеет как минимум три главных недостатка: во-первых, получение целевой мутации может быть достаточно трудоемким и дорогостоящим; во-вторых, в ходе случайного мутагенеза обыкновенно получают особей, гетерозиготных по мутации, поэтому обнаружение рецессивных мутаций может быть крайне затруднено. И, наконец, невозможно инактивировать каждый ген в геноме при помощи случайного мутагенеза: например, не учитываются летальные мутации. Из этого следует, что такой тип генетического скрининга ограничен по своей природе (Liu, Zhou et al., 2017).

В связи с ограничениями использования случайного мутагенеза и развитием молекулярно-генетических технологий для генетических манипуляций с данио начали использовать и другие методики: например, с участием ретровирусов (Amsterdam and Hopkins, 2004), а также инъекции в эмбрионы на ранних этапах развития мРНК или антисмысловых морфолиновых олигомеров, вызывающих повышение или снижение

уровня белковых продуктов целевых генов соответственно (Hammerschmidt, Blader et al., 1999; Nasevicius and Ekker, 2000). Морфолиновые олигомеры (МО) являются синтетическими аналогами нуклеиновых кислот, их длина обычно составляет около 25 нуклеотидов. Они стерически блокируют доступ других молекул к РНК путем связывания комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот (Summerton, 1999). Важно отметить, что недавнее исследование показало, что приблизительно 80% фенотипов рыб, полученных с помощью МО, не были успешно воспроизведены в мутантах, полученных разными методами редактирования генома (Kok, Shin et al., 2015). Это несоответствие обычно объясняется непродолжительным временем действия МО, вызванным деградацией МО и разбавлением их концентрации в ходе клеточных делений, а также неспецифичными взаимодействиями с продуктами сразу нескольких генов, вызванными высокими дозами МО. Примером является неспецифическая активация p53 (Robu, Larson et al., 2007).

Открытие явления РНК-интерференции и возможности использовать этот эволюционно консервативный механизм подавления экспрессии генов на уровне их транскриптов открыли новые возможности для развития технологии направленных нокдаунов (англ. *knockdown*, снижение экспрессии гена) генов у данио (Kelly and Hurlstone, 2011).

РНК-интерференция представляет собой процесс посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, в котором небольшие двуцепочечные молекулы РНК специфически взаимодействуют с мРНК, имеющими комплементарный им участок, и вызывают либо разрушение этих мРНК, либо подавления их трансляции. Эффекторные молекулы РНК могут быть либо экспрессирующимися в самой клетке – микроРНК (miRNA), либо экзогенными миРНК – малыми интерферирующими РНК (siRNA) (Kelly and Hurlstone, 2011). То, что двуцепочечные РНК можно использовать для экспериментального подавления экспрессии генов было впервые установлено в экспериментах с *Caenorhabditis elegans* (Fire, Xu et al., 1998).

Первые опыты с *D. rerio* были направлены в основном на инъекции в эмбрионы двуцепочечных РНК, но несмотря на первоначальные успехи, было установлено, что это вызывает у рыб общее снижение количества мРНК, возможно связанное с мощным клеточным интерфероновым ответом (Oates, Bruce et al., 2000). Использование малых интерферирующих РНК также было связано с возникновением множественных неспецифических эффектов (Zhao, Fjose et al., 2008). Помимо токсичности для эмбриона инъекций больших количеств миРНК и их нецелевых эффектов, главным ограничением является временный характер их действия, поэтому фокус внимания со временем сместился

к вариантам, базирующихся на ДНК-векторах и методиках трансгенеза, что могло дать возможность получить более продолжительное и, что важно, наследуемое в ряду поколений подавление экспрессии (Kelly and Hurlstone, 2011). Подобные системы, включающие в себя последовательности для синтеза будущей двуцепочечной РНК под контролем сильных эукариотических промоторов (например, промотор РНК-полимеразы III) показали хорошую эффективность при использовании в культурах клеток (Lee, Dohjima et al., 2002). Но несмотря на успехи в использовании РНК-интерференции на других модельных объектах, эта технология не показывает достаточной эффективности на данио, в отличие от использования морфолиновых олигомеров (Kelly and Hurlstone, 2011).

В последние несколько лет на передний план вышли технологии редактирования генома, основанные на программируемых нуклеазах, таких как TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) – подобные активаторам транскрипции эффекторные нуклеазы, ZFN – нуклеазы, содержащие цинковые пальцы (zinc-finger nucleases) и Cas9 (технология CRISPR/Cas9).

1.2. Система CRISPR/Cas9 как технология редактирования геномов

Прокариоты постоянно находятся в условиях соседства с огромным количеством вирусных частиц, угрожающих их существованию, и в ходе эволюции были вынуждены выработать механизмы защиты от них (Labrie, Samson et al., 2010). Один из этих механизмов опосредован локусами коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR). Эти локусы являются общими для прокариот и обнаружены примерно в 40% секвенированных геномов бактерий и 90% архей (Grissa, Vergnaud et al., 2007a; Kunin, Sorek et al., 2007; Sorek, Kunin et al., 2008).

Хотя о существовании локусов CRISPR было известно ещё в 1987 году (Ishino, Shinagawa et al., 1987), их роль в защите от чужеродных генетических элементов не была установлена вплоть до середины 2000-х годов, когда Мохика с коллегами опубликовали результаты работы по анализу спейсерных последовательностей. Данные этой научной группы указывали на то, что эти последовательности принадлежат фрагментам геномов бактериофагов, а также плазмид (Mojica, Diez-Villasenor et al., 2005).

С локусами CRISPR соседствуют ассоциированные с CRISPR элементы (Cas) – гены, которые фланкируют эти кластеры и кодируют белки, необходимые для нормального функционирования системы. Всё вместе это составляет уникальный адаптивный иммунитет прокариот, использующий нацеливаемые короткими РНК-гидами нуклеазы,

которые разрушают ДНК вируса в случае повторной инфекции (Bhaya, Davison et al., 2011; Bolotin, Quinquis et al., 2005; Makarova, Grishin et al., 2006).

Локусы CRISPR имеют сходное строение у разных представителей прокариот: консервативные повторы из 20-50 нуклеотидов и спейсеры примерно такой же длины между ними (Grissa, Vergnaud et al., 2007b; Rousseau, Gonnet et al., 2009). Именно эти спейсеры уникальны в пределах локуса и получены из фрагментов вирусных геномов, с которыми сталкивалась клетка, что позволяет прокариотам иметь совершенно особую форму иммунологической памяти – хранимой в виде генетической информации (Bolotin, Quinquis et al., 2005; Mojica, Diez-Villasenor et al., 2005).

Для функционирования всех систем CRISPR/Cas общими являются три основных шага: приобретение (или адаптация), экспрессия и интерференция (Barrangou, 2015b). Первый из них заключается в разрезании на короткие фрагменты (называемые протоспейсерами) ДНК вируса, попавшей в прокариотическую клетку при первом контакте с патогеном, и последующей интеграции их как спейсеров в локусы CRISPR (Barrangou, Fremaux et al., 2007). Впоследствии локус транскрибируется и образуется длинный полиспейсерный предшественник CRISPR РНК (pre-CRISPR-RNA, polyspacer precursor crRNA), в результате процессинга которого получается множество коротких активных CRISPR РНК (CRISPR-RNA, crRNA) (Brouns, Jore et al., 2008). Эти РНК взаимодействуют с одним или более белком, ассоциированным с CRISPR. В результате комплементарного взаимодействия между спейсерным регионом crRNA и протоспейсерной последовательностью вирусного генома при повторной инфекции эти белки привлекаются в район взаимодействия и запускают процесс разрушения чужеродной ДНК (Brouns, Jore et al., 2008).

На данный момент известны пять типов систем CRISPR/Cas, которые можно разделить на 2 класса: I класс (в него входят I, III и IV типы) имеет мультибелковые эффекторные комплексы, в то время как II класс (II и V типы) – всего один эффекторный белок (Barrangou, 2015a; Makarova and Koonin, 2015). Среди них тип II является наиболее изученным (наряду с типом I кишечной палочки *Escherichia coli*) и простым (Makarova, Wolf et al., 2015).

Эффекторный комплекс системы II-го типа содержит эндонуклеазу Cas9 и два РНК-компонента: CRISPR РНК (crRNA) и транскрибирующую CRISPR РНК (tracrRNA) (Deltcheva, Chylinski et al., 2011). Последняя нужна для правильного процессинга CRISPR РНК и формирования эффекторного комплекса, а сама CRISPR РНК содержит 20-

нуклеотидный спейсерный участок, транскрибированный с локуса CRISPR (Deltcheva, Chylinski et al., 2011).

Комплементарное взаимодействие этой CRISPR РНК с её мишенью приводит к разрушению чужеродного генетического материала эффекторным комплексом. Последовательность протоспейсера обязательно должна сопровождаться особым смежным с протоспейсером мотивом (protospacer adjacent motif, PAM), находящимся непосредственно у его 3'-конца (Gasiunas, Barrangou et al., 2012). Наличие правильной последовательности PAM необходимо для узнавания чужеродной ДНК и запуска эндонуклеазной активности Cas9, а наличие некомплементарных пар оснований внутри или в непосредственной близости от PAM нарушают образование гетеродуплекса и расплетание двухцепочечной ДНК мишени (Sternberg, Redding et al., 2014). Последовательность PAM позволяет системе CRISPR/Cas9 различать последовательности собственных локусов CRISPR и вирусной ДНК для того, чтобы не допустить разрушения собственной ДНК (Horvath, Romero et al., 2008; Marraffini and Sontheimer, 2010).

Сложность PAM отличается у разных видов прокариот, одним из самых простых вариантов является 5'-NGG у *Streptococcus pyogenes* (Jinek, Chylinski et al., 2012). Относительно небольшое число компонентов в сочетании с достаточной гибкостью в выборе нуклеотидной последовательности мишени (любые 5'-20 н.-NGG-3') стали предпосылками для скорого применения системы CRISPR/Cas II типа в качестве нового мощного и перспективного инструмента редактирования геномов.

Первая публикация, посвященная использованию системы CRISPR/Cas для редактирования генома, вышла в свет в 2012 году (Jinek, Chylinski et al., 2012). Авторы показали, что *in vitro* Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes* (spCas9) может использовать в качестве гидов программируемые химерные РНК и производить двунитевые разрывы ДНК в необходимых сайтах. В данной работе система CRISPR/Cas9 *S. pyogenes* была упрощена ещё больше и требовала для своего функционирования всего два компонента: spCas9 и синтетический РНК-гид (single guide RNA, sgRNA), содержащий ключевые элементы обоих видов РНК (crRNA и tracrRNA) (Jinek, Chylinski et al., 2012).

Б

РНК-гид

Cas9

3'-NNNNNNNNNNNN-5'
5'-NNNNNNNNNNNN-3'

GGAGCGAGCGGAGCGGTACA

PAM

Мишень

Рисунок 1. Схематическая иллюстрация естественной (А) и модифицированной для генетической инженерии (Б) системы CRISPR/Cas9 (адаптировано по (Hwang, Fu et al., 2013b)).

Вскоре сфера применения CRISPR/Cas расширилась и на клеточные системы: бактерии (Jiang, Bikard et al., 2013), культуры раковых и стволовых клеток человека (Cho, Kim et al., 2013; Jinek, East et al., 2013; Mali, Yang et al., 2013), дрожжи *Saccharomyces*

cerevisiae (DiCarlo, Norville et al., 2013), а затем и на целые организмы, в первую очередь модельные и хозяйственно важные объекты: нематоду *C. elegans* (Friedland, Tzur et al., 2013), лягушку *Xenopus tropicalis* (Nakayama, Fish et al., 2013), рис (Shan, Wang et al., 2014), пшеницу (Shan, Wang et al., 2014), плодовую мушку *Drosophila melanogaster* (Yu, Ren et al., 2013), шелкопряда *Bombyx mori* (Wang, Li et al., 2013), мышь (Wang, Yang et al., 2013) и даже на приматов (Niu, Shen et al., 2014). Одним из первых таких объектов был и *Danio rerio* (Hwang, Fu et al., 2013a; Hwang, Fu et al., 2013b).

Cas9 производит двунитевой разрыв в районе последовательности мишени, затем следует его репарация. В зависимости от того, какой механизм – гомологичная рекомбинация или нехомологичное объединение концов – превалирует у данного вида, она идет по одному из этих вариантов (Ceccaldi, Rondinelli et al., 2016). Нехомологичное объединение концов часто приводит к возникновению коротких инсерций и делеций, которые нарушают функцию гена (например, приводят к сдвигу рамки считывания и возникновению в РНК преждевременного стоп-кодона) (Xiao, Wang et al., 2013). При помощи основанной на гомологии репарации можно заменять фрагмент гена на последовательность привнесенной в клетку матрицы, имеющей участки гомологии с редактируемым фрагментом генома. Таким образом можно вносить известные замены, что особенно удобно у организмов, у которых гомологичная рекомбинация является основным путем репарации двунитевых разрывов (бактерия *E. coli*, дрожжи *S. cerevisiae*) (Garst, Bassalo et al., 2017).

В отличие от технологий, основанных на TALEN и ZFN, CRISPR/Cas9 не требует сложного белкового дизайна в виде конструирования для каждого нового геномного сайта доменов цинковых пальцев или ДНК-связывающих доменов у TALEN. Так как РНК-гид связывается с ДНК благодаря традиционному Уотсон-Криковскому спариванию азотистых оснований, создание эффекторного комплекса для каждой новой мишени резко упрощается и унифицируется (Sander and Joung, 2014; Xiao, Wang et al., 2013). Кроме того, с внедрением этой технологии стали доступны для редактирования участки, которые ранее были плохо подвержены действию TALEN и ZFN, например, сильно метилированные последовательности (Hsu, Scott et al., 2013).

В особенности CRISPR/Cas9 превосходит TALEN и ZFN в одновременном получении нескольких мутаций: использование комбинации из нескольких РНК-гидов позволяет получать мутации в нескольких генах одновременно с высокой эффективностью (Jao, Wente et al., 2013; Ma, Chang et al., 2014), что затруднительно в случае использования нескольких

ZFN или TALEN из-за повышенного риска получения нецелевых эффектов вследствие перекрестных реакций между парами нуклеаз (Sollu, Pars et al., 2010).

Также при помощи этой технологии возможно получать протяженные делеции или инверсии (протяженностью вплоть до нескольких миллионов нуклеотидов), что особенно важно в изучении регуляторных и не кодирующих белки последовательностей, генных кластеров, генов с несколькими стартовыми кодонами или несколькими вариантами транскриптов, где предпочтителен именно такой вариант (Xiao, Wang et al., 2013). Для этого необходимо использовать пару РНК-гидов, мишени которых фланкируют участок, который необходимо делетировать или инвертировать. Подобные мутанты уже были получены как у растений (Wang, Geng et al., 2017), так и животных (Kato, Hara et al., 2017; Xiao, Wang et al., 2013).

Сейчас существует множество вариантов использования технологии CRISPR/Cas9 (порою даже весьма экзотичных). Например, использование Cas9 неспособной к нуклеазной активности (так называемая dCas9), которая слита с доменами белков активаторов или репрессоров транскрипции, и может использоваться для направленного повышения или снижения экспрессии генов соответственно (Gilbert, Larson et al., 2013).

Активно разрабатываются методики с использованием нуклеаз Cas других видов бактерий, например, *Campylobacter jejuni* (Kim, Koo et al., 2017) и *Staphylococcus aureus*, имеющих меньший размер, чем Cas9 *Streptococcus pyogenes* (Ran, Cong et al., 2015). Это удобно для создания единых векторов на основе аденоассоциированных вирусов (содержащих последовательности для синтеза и нуклеазы и РНК-гидов), которые можно использовать в генной терапии (Brooks and Gaj, 2018).

Например, Cas9 *Staphylococcus aureus* была использована для исправления мутации сайта сплайсинга в мышинной модели мышечной дистрофии I типа, и исправления мутации в гене орнитинтранскарбамилазы в печени мышей с дефицитом этого фермента – редким сцепленным с X хромосомой нарушением метаболизма, приводящим к повышенному уровню аммиака в крови (Brooks and Gaj, 2018).

Ещё одним новым применением технологии CRISPR/Cas9 является методика конверсии одного азотистого основания в другое без возникновения двунитевого разрыва. Используя фермент, полученный путем слияния нуклеазы Cas9 (варианта, который может произвести только односторонний разрыв) с цитидиндезаминазой или аденозиндезаминазой, пары C-G и A-T могут быть преобразованы в T-A и G-C соответственно (Brooks and Gaj, 2018).

Основной проблемой данной технологии по-прежнему остаются возможные нецелевые эффекты нуклеазы Cas9, например, появление мутаций в других локусах. Предсказание и детекция таких мутаций для каждого конкретного РНК-гида весьма затруднительны (O'Geen, Henry et al., 2015). Предсказанные исходя из сходства нуклеотидных последовательностей нецелевые сайты можно проверять, используя трудоемкие низкопроизводительные методы, дающие возможность оценить небольшое количество мишеней (например, использование эндонуклеазы I фага T7, разрезающей ДНК с неспаренными основаниями, или амплификация и секвенирование определенных участков генома). Высокопроизводительные методы позволяют анализировать большое количество возможных нецелевых мутаций, но, например, полногеномное секвенирование по-прежнему остается достаточно дорогими и является не очень удобным способом из-за большого количества избыточных данных (O'Geen, Henry et al., 2015).

1.3. Транспортёры серотонина у человека и других млекопитающих

Моноаминергическая сигнальная система является ключевым компонентом, контролирующим многие аспекты здоровья человека, в том числе его психологическое состояние. Один из главных элементов в этой системе – нейромедиатор серотонин. Нарушения в серотонинергической системе мозга вовлечены в патофизиологию многих заболеваний: тревожности (Lesch, Zeng et al., 2003), депрессии (Ressler and Nemeroff, 2000), обсессивно-компульсивного расстройства (Bengel, Greenberg et al., 1999), патологической агрессии и антисоциального поведения (Lesch and Merschdorf, 2000), зависимости от наркотиков (Kreek, Nielsen et al., 2005) и склонности к совершению самоубийства (Arango, Underwood et al., 2002). Например, хотя результаты отдельных исследований разнятся, мета-анализ обнаруживает тенденцию к сниженной представленности транспортеров серотонина у пациентов с большим депрессивным расстройством (Spies, Knudsen et al., 2015)

Уровень серотонина, представленного в синаптической щели и доступного для действия на рецепторы на поверхности нейрона, зависит от его обратного захвата транспортером серотонина, находящегося на мембране пресинаптической клетки (в основном на мембранах нейронов, расположенных в ядрах шва (лат. *nuclei raphes*) (Haddley, Bubb et al., 2012).

Транспортер серотонина относится к семейству Na^+/Cl^- зависимых транспортеров и у человека кодируется геном *SLC6A4* (Haddley, Bubb et al., 2012). Несмотря на преимущественную локализацию серотонинергических нейронов в ядрах шва, они

иннервируют множество областей мозга, которые считаются ответственными за регуляцию поведения и познавательную способность (McLaughlin, Little et al., 1996).

У млекопитающих транспортер серотонина является ключевым регулятором доступности этого нейромедиатора, поэтому ожидаемо, что любое изменение в экспрессии или активности транспортера должно находить проявление в поведении животного или человека, а серотониновый транспортер стал главной мишенью многих антидепрессантов, наркотиков и потенциальных нейротоксинов (Haddley, Bubb et al., 2012).

У человека в гене, кодирующем серотониновый транспортер, есть несколько полиморфных регионов: полиморфная область 5-HTTLPR (5-HT transporter linked polymorphic region, сцепленный с транспортером серотонина полиморфный участок), обнаруженная в промоторной области гена, и STin2 VNTR (Serotonin transporter intron 2 variable number tandem repeat, полиморфизм по количеству tandemных повторов во втором интроне серотонинового транспортера) (Haddley, Bubb et al., 2012). Различные варианты этого гена могут вызывать 20-кратные различия в экспрессии транспортера серотонина и функциональном уровне в системах *in vitro* (Murphy, Fox et al., 2008).

Наиболее изученным из этих вариантов является 5-HTTLPR. Считается, что 5-HTTLPR находится в регуляторном участке и связан с активностью промотора гена *SLC6A4*, это приводит к различиям в транскрипционной активности разных аллелей и, соответственно, разнице в эффективности процесса обратного захвата серотонина (Houwing, Buwalda et al., 2017).

5-HTTLPR имеет в своём составе GC-богатые повторяющиеся элементы, имеющие длину 20-23 нуклеотида, в количестве 14 повторов (short, S – аллель с низким уровнем экспрессии) или 16 повторов (long, L – аллель с высоким уровнем экспрессии). Однако, есть аллели с 17-22 повторами (XL) (Goldman, Gleib et al., 2010). По сравнению с носителями длинного варианта 5-HTTLPR, носители хотя бы одной короткой аллели имеют сниженный уровень мРНК транспортера серотонина, что ведет к пониженному захвату серотонина в лимфоцитах и тромбоцитах (Houwing, Buwalda et al., 2017).

Характер 5-HTTLPR в сочетании с неблагоприятными событиями в детском возрасте связан с повышенной склонностью к стрессу и риском развития психических расстройств, таких как депрессия, тревожность и патологическая агрессивность. В частности, этот риск повышен у людей с коротким вариантом аллели (Houwing, Buwalda et al., 2017).

У грызунов полиморфизм в этом регионе гена серотонинового транспортера отсутствует, но нокаутные по этому гену животные являются хорошей моделью носительства S-аллели у человека. Такие животные, в особенности гетерозиготы, демонстрируют тот же фенотипический эффект в виде сниженной эффективности захвата серотонина, который присутствует у людей и некоторых других приматов с коротким вариантом 5-HTTLPR (Houwing, Buwalda et al., 2017).

Изменение в уровне серотонина в мозге у нокаутных грызунов сопровождается изменением поведения этих животных (Kalueff, Olivier et al., 2010). Мыши, нокаутные (англ. *knockout* – нарушение структуры гена, приводящее к отсутствию его экспрессии) по гену серотонинового транспортера, были получены в 1998 году, затем, в 2006 году, за ними последовали нокаутные крысы. Обе модели демонстрируют нарушения в серотонинергической системе, измененную болевую чувствительность, повышенный уровень тревожности, сниженное социальное взаимодействие с другими животными, трудности в принятии решений (Kalueff, Olivier et al., 2010).

Помимо этого, около 90% серотонина в человеческом теле приурочено к энтерохромаффинным клетками кишечника, где он играет роль в регуляции перистальтики (Berger, Gray et al., 2009). Гастроинтестинальный серотонин затем захватывается тромбоцитами периферической крови также за счет работы транспортера серотонина. Серотонин тромбоцитов участвует в регуляции гемостаза и свертывания крови, при выделении из них в высоких концентрациях вызывая вазоконстрикцию (сужение кровеносных сосудов), а при его физиологическом уровне – вазодилатацию (расширение), опосредованную высвобождением оксида азота из клеток эндотелия (Berger, Gray et al., 2009).

1.4. Транспортеры серотонина у *Danio rerio*

Многие гены у костистых рыб возникли в ходе дополнительного раунда полногеномной дупликации. Часто такие гены принято называть «онологами» в честь С. Оно, впервые предположившего наличие специфической для костистых рыб дупликации генома (Herculano and Maximino, 2014; Ohno, Wolf et al., 1968). Гены двух транспортеров серотонина у зебрадании являются такими онологами. Они были клонированы в 2006 году (Wang, Takai et al., 2006).

Итак, *Danio rerio* имеют два транспортера серотонина: SertA (кодируемого геном *slc6a4a*, который локализован в 15 хромосоме) и SertB (*slc6a4b*, в 5 хромосоме). SertA состоит из 693 аминокислотных остатков, имеет 12 трансмембранных домена и

демонстрирует высокий уровень сходства с транспортерами серотонина у крысы и человека (Wang, Takai et al., 2006). Гибридизация *in situ* позволила установить, что SertA у эмбрионов данио в основном приурочен к ядрам шва (лат. *nuclei raphe*), вентральному заднему бугорку (*ventral posterior tuberculum*), эпифизу. Экспрессия SertA в ядрах шва и вентральном заднем бугорке совпадает с локализацией серотонина и экспрессией триптофан гидроксилазы – ключевого фермента синтеза этого нейромедиатора (Wang, Takai et al., 2006). Другой транспортер серотонина, SertB, локализуется в основном в продолговатом мозге (лат. *medulla oblongata*) и внутреннем зернистом слое сетчатки (Wang, Takai et al., 2006). В мозге взрослой рыбы SertA обнаруживается в дорсальной и вентральной части перивентрикулярного предкрышечного ядра (*periventricular pretectal nucleus*), передних и задних ядрах шва, в то время как SertB – в паравентрикулярном органе и каудальной зоне перивентрикулярного гипоталамуса (Norton, Folchert et al., 2008).

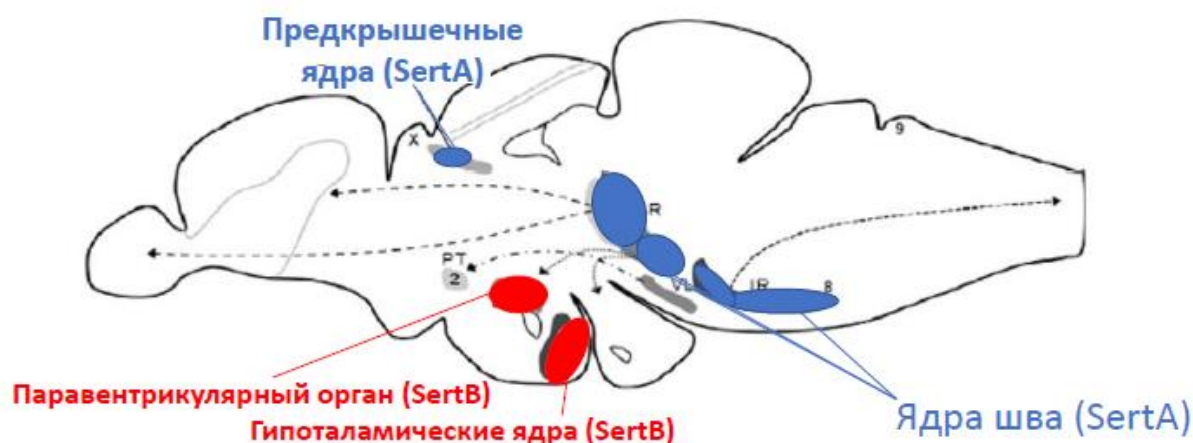


Рисунок 2. Примерная локализация транспортеров серотонина в головном мозге взрослой особи *Danio rerio* (адаптировано по (Herculano and Maximino, 2014)).

Степень сходства между последовательностями SertA и SertB составляет 76,5%. Сходство SertA данио с транспортерами серотонина человека, крысы, мыши, курицы и коровы находится в промежутке между 66 и 69%, при том, что сходство SertA с транспортерами дофамина и норадреналина менее 50%. SertB схож с транспортерами серотонина других позвоночных примерно на 75% (Wang, Takai et al., 2006).

Также у рыб есть слабо специфичные, но высокопроизводительные Na-независимые механизмы транспорта серотонина, связанные с тремя изоформами транспортера органических катионов (ОСТ1-3) и транспортером моноаминов в плазматической мембране (PMAT), но эти пути остаются слабо охарактеризованными (Duan and Wang, 2010).

Серотонинергическая система мозга вовлечена у рыб в тревожное поведение, ответ на стресс, агрессию, состояние, схожее с депрессивным (Herculano and Maximino, 2014). Некоторые из этих аспектов поведения данио поддаются измерениям благодаря наличию отлаженных поведенческих тестов. Например, для тревожного поведения хорошо разработаны тест новой камеры и черно-белая коробка, являющиеся аналогичными тестам тревожности у грызунов, они основываются на конфликте мотивации животного между исследовательским поведением и избеганием опасности (Kysil, Meshalkina et al., 2017). В то же время тесты схожего с депрессией поведения разработаны у данио недостаточно, и их разработка сопряжена с множеством методических трудностей (Herculano and Maximino, 2014).

2. Материалы и методы

2.1. Праймеры

Табл. 1. Используемые в работе праймеры и их последовательности

Название праймера	Последовательность праймера (5'- 3')
SERTA primer 1 F	CTCCAATGGTTATCGCAGTACA
SERTA primer 1 R	GAGCGGGTAGCTCTATCTTTCA
SERTA primer 13 F	GACACTTCTTTGAAGCTGAGCA
SERTA primer 13 R	TGTGTTTGTGCTACATGTCCAG
SERTB primer 1 F	AACTCTTGCTCAATCCTGAAGC
SERTB primer 1 R	AAATTTTCAGACGGCACTTTGAG
SERTB primer 12 F	CTCACTGTTGAACCCTCAAACC
SERTB primer 12 R	TTAAGAGAGCCTGGAGTCCAAA
T7_SERTA_exon1_F	TTAATACGACTCACTATAGGTCGGTCATCGGGTATGCAG
T7_SERTA_exon13_F	TTAATACGACTCACTATAGGCTAAAGGGTATTACCCCCG
T7_SERTB_exon1_F	TTAATACGACTCACTATAGGATCTGTTATCAAAACGGCGG
T7_SERTB_exon12_F	TTAATACGACTCACTATAGGAATTGGGATCCATATGAAGG
hairpin_reverse	AAAAGCACCGACTCGGTGCC
Px330_seq_primer	CGTGACGTAGAAAGTA
SERTA guide 1 R	AAACCTGCATACCCGATGACCGAC
SERTA guide 13 R	AAACCGGGGGTAATACCCTTTAGC
SERTB guide 1 R	AAACCCGCCGTTTTGATAACAGATC
SERTB guide 12 R	AAACCCTTCATATGGATCCCAATTC
M13dirL	GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG
T3promoter_exact	CGCGCAATTAACCCTCACTAAAG
SertA_1ex_upstream	CTGTTCCACCCCTTAACCCC
SertA_1ex_downstream	TAGCTGTTGATTGAGCGGCA
SertB guide 1 F	CACCGATCTGTTATCAAAACGGCGG
Seq_primer_article	CTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTTCG

2.2 Среды и растворы, использованные в работе

2YT: 1,6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl.

SOB: 2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄. Раствор солей магния добавляли непосредственно перед использованием среды, стерилизовали фильтрованием через предварительно промытую мембрану с порами 0,22 мкм.

ТВ: 250 мМ KCl, 10 мМ Pipes, 15 мМ CaCl₂, 55 мМ MnCl₂. Смешивали все компоненты, кроме MnCl₂ и доводили pH до 6,7 при помощи KOH. Добавляли MnCl₂ и фильтровали раствор через предварительно промытую мембрану с порами 0,22 мкм и хранили при 4 °С.

SB: 3,2% пептон, 2% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl.

TAE: 40 мМ Tris HCl, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,5.

TBE: 90 мМ Tris HCl, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА.

E3: 5 мМ NaCl, 0,17 мМ KCl, 0,33 мМ CaCl₂ x 2H₂O, 0,33 мМ MgSO₄ x 7H₂O.

5х буфер MOPS: 200 мМ MOPS, 50 мМ ацетат натрия, 5 мМ ЭДТА (pH 8,0). Доводили pH раствора до 7,0 при помощи раствора 5 М NaOH. Для приготовления использовалась вода, обработанная DEPC в течение ночи. После приготовления раствор автоклавировали.

Буфер для проб РНК: 10 мл деионизированного формамида, 3,5 мл 37% формальдегида, 2 мл 5Х буфера MOPS.

2% агарозный гель с формальдегидом: 20 мл 5Х буфера MOPS, 72 мл воды, не содержащей нуклеазы, 2 г агарозы. После растапливания агарозы, раствор охлаждали примерно до 55 °С и добавляли 17,6 мл 37% формальдегида и 5 мкл раствора бромистого этидия с концентрацией 10 мг/мл.

Буфер для нанесения нуклеиновых кислот: 50% глицерола, 1 мМ ЭДТА, 0,4% бромфенолового синего.

2.3. Методы работы с бактериями и плазмидами

2.3.1. Приготовление химически компетентных *Escherichia coli* (Inoue, Nojima et al., 1990)

Получали единичные колонии бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue путем наращивания на твердой среде 2YT с 25 мкг/мл тетрациклина при 37°C в течение ночи. На следующий день инокулировали 30 мл автоклавированной среды SOB в колбе объемом 250 мл одной бактериальной колонией. Выращивали клетки при 18 °С на качалке при 250 об./мин трое суток. После этого помещали колбу на 10 минут в лед, переносили в предварительно охлажденную 50 мл пробирку и центрифугировали при 2500 g при 4 °С в течение 10 минут. Удаляли надосадочную фракцию и осторожно ресуспендировали осадок в 10 мл охлажденного ТВ и инкубировали суспензию во льду 10 минут, после чего центрифугировали при 2500 g при 4 °С в течение 10 минут. Удаляли надосадочную

фракцию, осторожно ресуспендировали осадок в 2,5 мл охлажденного ТВ и добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) до конечной концентрации 7% (175 мкл) и осторожно перемешивали вращением пробирки. Инкубировали во льду в течение 10 минут. Расфасовывали суспензию по предварительно охлажденным пробиркам Eppendorf на 1,5 мл (по 100 мкл на пробирку) и немедленно замораживали в жидком азоте. Аликвоты хранили при -70 °C.

2.3.2. Трансформация бактерий *Escherichia coli* ((Inoue, Nojima et al., 1990), с изменениями)

Аликвоту компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*) размораживали во льду. После этого добавляли предварительно охлажденную плазмидную ДНК в количестве 200 пг - 10 нг в объеме 1-5 мкл и инкубировали во льду в течение 30 минут, периодически аккуратно встряхивая. По окончании инкубации, подвергали клетки тепловому шоку, поместив пробирки на 30 с в термостат с температурой 42°C. Затем возвращали пробирки с бактериями в лед на 5 мин. После чего добавляли в них по 800 мкл среды SOB без магния, а также 10 мкл 2М раствора Mg^{2+} и инкубировали клетки в течение 60 мин при температуре 37 °C, периодически аккуратно помешивая переворачиванием пробирок. Высеивали по 50 или 100 мкл получившейся суспензии на чашки Петри с твердой средой 2YT с 100 мг/л ампициллина и инкубировали в течение ночи при 37°C. Чашки с бактериями хранили не более месяца при температуре 4 °C.

2.3.3. Выделение плазмид из культур *E. coli*

Для выделения плазмид при помощи набора для очистки плазмидной ДНК GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) брали колонию трансформированных *E. coli* и переносили их в 15 мл пробирки с 2-3 мл среды SB (не более 1/5 объема пробирки или колбы) с 200 мг/л селективного антибиотика ампициллина и наращивали ночь (14-16 часов) при температуре +37 °C и постоянной интенсивной аэрации. После наращивания культуры центрифугировали при 6800g 5 мин при комнатной температуре.

Для выделения набором GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) бактерий наращивали 8-10 часов в 2-3 мл среды SB с 200 мг/л ампициллина, затем переносили 1 мл инокулята в колбы объемом 500-1000 мл, содержащие 100-200 мл среды SB и наращивали ночь (14-16 часов) при температуре +37 °C и постоянной интенсивной аэрации до оптической плотности не более 2-3 единиц ($OD_{600\text{ нм}} = 2-3$). После наращивания культуры центрифугировали при 5000g 10 мин при комнатной температуре.

Очистку плазмидной ДНК производили согласно инструкциям производителя наборов для очистки.

Качество очищенных плазмид проверяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл в буфере TAE в камерах Sub-Cell® GT (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием источника тока PowerPac™ Universal (Bio-Rad Laboratories, США) при напряженности электрического поля 4-5 В/см. Подвижность пробы в геле оценивали по подвижности красителя бромфенолового синего, добавляемого в пробы вместе с глицерином непосредственно перед нанесением. Анализ гелей после проведения гель-электрофореза производили на анализаторе GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, США).

Концентрацию ДНК в полученном растворе устанавливали при помощи спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.4. Создание плазмидных векторов для технологии CRISPR/Cas9

2.4.1. Дизайн олигонуклеотидов для CRISPR/Cas9

Для подбора последовательностей мишеней в генах *slc6a4a* и *slc6a4b* был использован специальный онлайн-сервис <http://chopchop.cbu.uib.no/>. Он позволяет подбирать 20-нуклеотидные протоспейсерные последовательности, с учетом непосредственной близости к последовательности PAM и минимизации возможных комплементарных взаимодействий РНК-гидов с участками в других генах.

На основе выбранных мишеней подбирали состав последовательности, с которой в дальнейшем должен производиться синтез РНК-гидов, с учетом её клонирования в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Ran, Hsu et al., 2013) (см. рис. 3.). Для увеличения эффективности экспрессии с промотора U6 добавляли G в начале последовательности, если первым нуклеотидом являлся любой другой нуклеотид. Затем получали комплементарный этой последовательности олигонуклеотид. Дополнительно в начале последовательности олигонуклеотида гида добавляли последовательность CACC, а для его комплементарного олигонуклеотида – AAAC. Это необходимо для создания липких концов и повышения эффективности лигирования получившейся конструкции в вектор (Bauer, Canver et al., 2015).

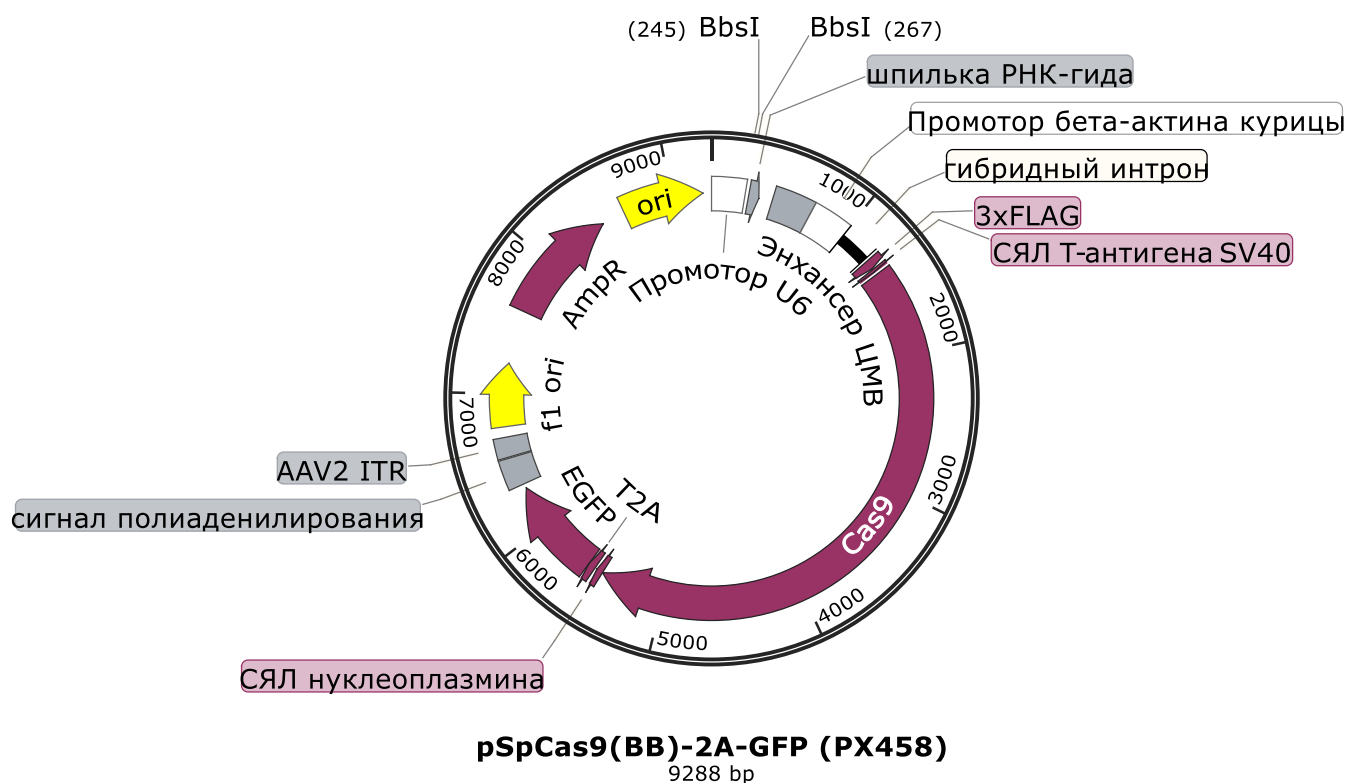


Рисунок 3. Карта плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene plasmid # 48138). СЯЛ – сигнал ядерной локализации, T2A – 2A пептид из капсида вируса *Thosea asigna*, ori – ориджин репликации, AmpR – ген устойчивости к ампициллину, EGFP – enhanced green fluorescent protein (улучшенный зеленый флуоресцентный белок), AAV2 ITR – нетранслируемый регион из аденоассоциированного вируса, bp – пар оснований.

Последовательности мишеней для технологии CRISPR/Cas9 подбирали так, чтобы для каждого из генов первая находилась в 1-м экзоне, а вторая – в дистальной части гена (12-13 экзоны) (рис. 4). При образовании обоих двуцепочечных разрывов в гене *slc6a4a* ожидаемый размер делеции составляет порядка 9 тыс. п. н., а в гене *slc6a4b* – 16 тыс. п. н. Также возможно образование инверсий данных фрагментов.

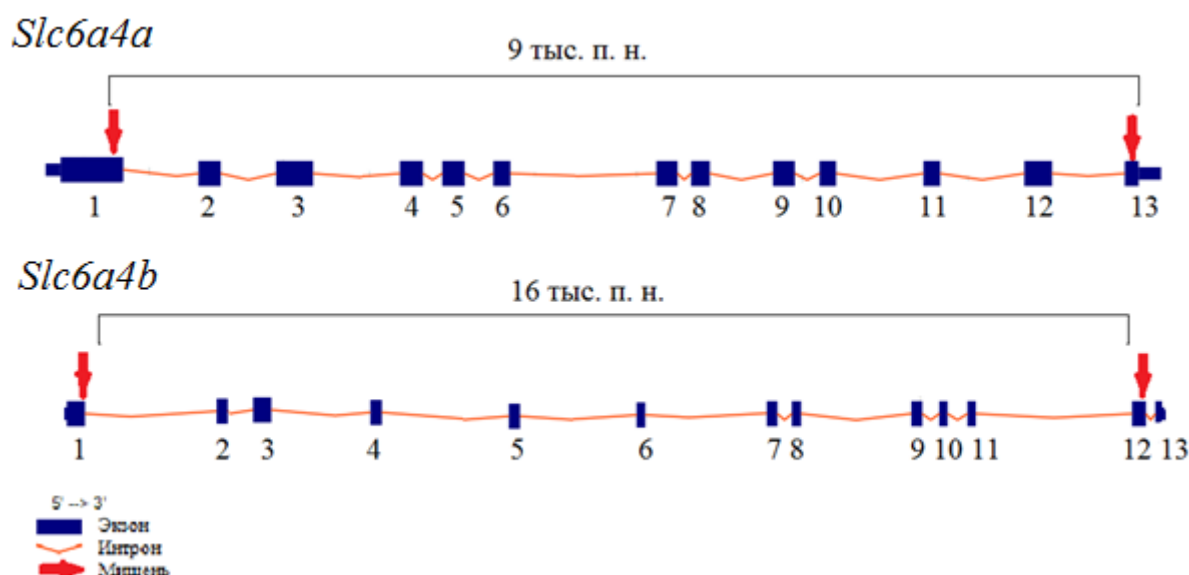


Рисунок 4. Расположение последовательностей мишеней в пределах генов транспортеров серотонина (*slc6a4a* и *slc6a4b*).

2.4.2. Конструирование плазмид для технологии CRISPR/Cas9

Рестриктию плазмид pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) производили ферментом BbsI (New England Biolabs, США) в количестве 5 единиц активности и 5,8 мкг плазмидной ДНК на реакцию 1 час при 37 °С, общий объем реакционной смеси 100 мкл. Далее проводили препаративный гель-электрофорез в 1% агарозном геле и очистили рестрицированную плазмиду из него при помощи набора Cleanup Standard (Евроген, Россия).

Растворили необходимые олигонуклеотиды для CRISPR/Cas9 в деионизированной воде до концентрации 100мМ. Смешали по 1 мкл прямого и комплементарного ему олигонуклеотида, 1 мкл T4 Ligation Buffer (Thermo Fisher Scientific, США), 6,5 мкл деионизированной воды, 0,5 мкл полинуклеотидкиназы фага T4 (10 000 единиц активности/мл) (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в термоциклере T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием следующей программы: 37 °С - 30 мин; 95 °С - 5 мин и плавное охлаждение до 25 °С со скоростью 5 °С/мин. Затем развели полученные дуплексы 1:10 в деионизированной воде для получения концентрации 1мкМ.

Для каждой лигазной реакции использовали 100 нг плазмиды PX458 после рестрикции BbsI, 1 мкл дуплексов олигонуклеотидов (1мкМ), 2,5 мкл T4 Ligation Buffer (Thermo Fisher Scientific, США), 0,375 мкл лигазы фага T4 (2 000 000 единиц активности/мл) (Thermo Fisher Scientific, США) и деионизированной воды до конечного объема 25 мкл и

инкубировали при 22°C 30 мин. После этого производили трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue с 1 мкл получившейся лигазной смеси.

2.4.3. Валидация векторов для CRISPR/Cas9 при помощи ПЦР и секвенирования

Для проверки 4 плазмид, полученных на основе PX458, на предмет успешности вставки олигонуклеотидов было использовано два метода: полимеразная цепная реакция и секвенирование ДНК.

Для ПЦР были взяты следующие праймеры (5'- 3'): прямой праймер для проверки всех 4 конструкций Px330_seq_primer CGTGACGTAGAAAGTA; в качестве обратного праймера: для конструкции, с которой будут экспрессироваться РНК-гиды комплементарные к участку в 1-ом экзоне гена *slc6a4a* - SERTA guide 1 R: AAACCTGCATACCCGATGACCGAC; в 13-ом экзоне гена *slc6a4a* - SERTA guide 13 R: AAACCGGGGGTAATACCCTTTAGC; в 1-ом экзоне гена *slc6a4b* - SERTB guide 1 R: AAACCCGCCGTTTTGATAACAGATC; в 12-ом экзоне гена *slc6a4b* - SERTB guide 12 R: AAACCTTCATATGGATCCCAATTTC. Ожидаемый продукт реакции в каждом случае составляет около 160 п.н.

Полимеразную цепную реакцию производили с использованием набора для проведения ПЦР High Yield PCR EcoDry™ Premix (Clontech Laboratories, США) на амплификаторе T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: 98 °C – 3 мин, (98°C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин) – 34 раза, 72 °C – 1 мин.

Анализ продуктов реакции производили методом гель-электрофореза ДНК в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл в буфере TBE в камерах Sub-Cell® GT (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием источника тока PowerPac™ Universal (Bio-Rad Laboratories, США) при напряженности электрического поля 3,5-4 В/см. Подвижность пробы в геле оценивали по подвижности красителя бромфенолового синего, добавляемого в пробы вместе с глицерином непосредственно перед нанесением. Анализ агарозных гелей после проведения гель-электрофореза производили на анализаторе GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, США).

Секвенирование плазмид производили в биотехнологической компании «Евроген» (Москва, Россия) с использованием праймера Seq_primer_article (5'-3') STATTGACGTCAATGGGCGGGGGTTCG. Анализ результатов секвенирования

производили в программе UGENE (Unipro, Россия) версии 1.20.0 (Okonechnikov, Golosova et al., 2012)

2.5. Методы работы с *Danio rerio*

2.5.1. Условия содержания рыб

В работе использовали рыб короткохвостой формы *Danio rerio*. Рыб содержали в аквариумах с температурой воды 28°C при цикле свет : темнота 12:12 часов, кормление осуществляли сухими кормами 1-2 раза в день. Икру содержали при температуре 28°C в среде для эмбрионов E3 с добавлением метиленового синего для предотвращения грибкового заражения. Мальков перемещали в стаканы, а затем аквариумы с системной водой с добавлением метиленового синего и кормили кормом для личинок Larval AP100 (Zeigler, США) с 4 по 9 дни после оплодотворения, затем добавляли в корм науплиусы артемии.

2.5.2. Скрещивание *D. rerio*

Для получения оплодотворенной икры производили следующую процедуру скрещивания: самцов и самок данио в течение 3-4 дней содержали отдельно, после этого их ссаживали в аквариумах с низким уровнем воды (8-10 см над контейнером) и контейнерами с решетками для сбора икринок на дне. Утром следующего дня включали освещение и после завершения явного полового поведения контейнеры для сбора икры изымали и быстро отбирали из них оплодотворенную икру. Икру помещали в среду E3 с метиленовым синим.

2.5.3. Проведение микроинъекций

Инъекции проводили на стадии 1-4 клеток на микроинъекторе Narishige IM-300 (Narishige group, Япония) с использованием бинокуляра и механического микроманипулятора. Изготовление игл для микроинъекций производили на пуллере Sutter Instrument Flaming/Brown micropipette puller model P-1000 (Sutter Instrument, США). Инъецировали не более 10% от объема клетки. Общая концентрация ДНК в смеси для инъекций составляла 100 нг/мкл, в случае РНК использовали концентрации 50 нг/мкл для каждого из РНК-гидов и 300 нг/мкл для мРНК Cas9 в 2 М растворе KCl с красителем феноловым красным, предварительно профильтрованным через мембрану с порами 0,22 мкм.

Оценку флуоресценции EGFP в эмбрионах, инъецированных плазмидами, производили на универсальном стереоскопическом комплексе для макроскопического

исследования флуоресценции в тканях, эмбрионах, срезах на базе флуоресцентного моторизованного стереомикроскопа Leica M205 FA (Leica, Германия).

2.6. Методы, использованные для генотипирования особей

2.6.1. Получение образцов тканей (хвостовых плавников) и выделение из них геномной ДНК (Meeker, Hutchinson et al., 2007)

Работу с рыбами начинали после достижения ими возраста 1 месяц. Для получения образцов тканей их осторожно отлавливали сачком из аквариума и помещали на ватный тампон, смоченный водой. Придерживая рыбу рукой, аккуратно отрезали небольшой фрагмент хвостового плавника пружинными микрохирургическими ножницами и помещали рыбу в аквариум с водой, содержащей метиленовый синий, для предотвращения инфекций. Ткань помещали в микроцентрифужные пробирки, содержащие 50 мМ NaOH. Объем жидкости должен быть достаточным для полного погружения ткани (20-200 мкл). Затем образцы нагревали до 95°C 10-20 мин, пока ткань не становилась заметно рыхлой. Пробирки охлаждали до 4°C, а затем для нейтрализации раствора щелочи добавляли 2 М Трис-HCl с pH 8,0 в количестве 1/20 от объема пробы. Образец центрифугировали 10 минут при 14 000g, чтобы осадить остатки тканей, после этого 1-3 мкл раствора использовали для проведения ПЦР.

2.6.2. Генотипирование особей при помощи полимеразной цепной реакции

Подбор праймеров для генотипирования мутантных особей производили при помощи онлайн-сервиса ChopChop: <http://chopchop.cbu.uib.no/>, дополнительно анализировали вероятности образования праймерами димеров или шпилечных структур, а также температуры плавления праймеров с использованием ресурса <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. При анализе температуры согласно руководству к набору для проведения полимеразных цепных реакций Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) использовали следующие параметры реакционной смеси: концентрация праймера 0,2 мкМ, концентрация катионов магния 3,5 мМ, общая концентрация дезоксирибонуклеотидтрифосфатов 0,8 мМ.

Таким образом, для генотипирования мутантов по гену *slc6a4a* были подобраны 2 пары праймеров (5'-3'). В пределах 1-го экзона: прямой праймер (SERTA primer 1F) CTCCAATGGTTATCGCAGTACA и обратный праймер (SERTA primer 1R) GAGCGGGTAGCTCTATCTTTCA. В пределах 13-го экзона: прямой праймер (SERTA primer 13F) GACACTTCTTTGAAGCTGAGCA и обратный праймер (SERTA primer 13R) TGTGTTTGTGCTACATGTCCAG. Размер ожидаемых продуктов реакции при отсутствии

мутации составляет 590 и 245 п.н., при делеции – 280 п.н., при инверсии участка гена – 520 и 320 п.н. Для пояснения см. рис. 5.

Такая же схема была использована и для гена *slc6a4b*: прямой праймер (SERTB primer 1F) ААСТСТТГСТСААТСТГААГС и обратный (SERTB primer 1R) АААТТТСАГАСГГСАСТТТГАГ в пределах 1 экзона и пара (SERTB primer 12F) СТСАСТГТТГААСССТСАААСС и (SERTB primer 1R) ТТААГАГАССТГГАГТССААА в 12 экзоне. Размер ожидаемых продуктов реакции при отсутствии мутации составляет 585 и 150 п.н., при делеции – 475 п.н., при инверсии участка гена – 520 и 220 п.н.

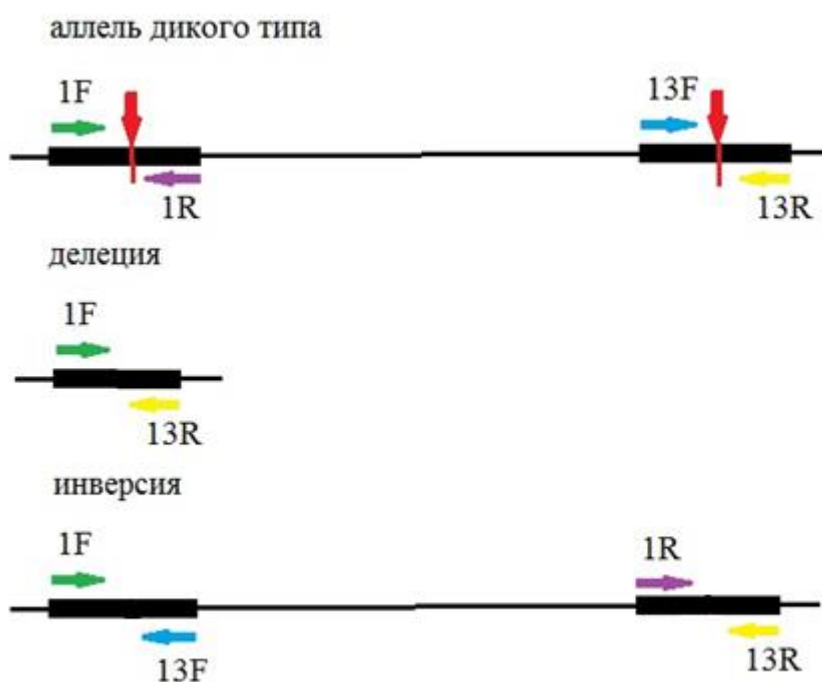


Рисунок 5. Схема расположения сайтов посадки праймеров для генотипирования в пределах гена. Красная стрелка указывает на расположение мишеней РНК-гида и Cas9.

Синтез праймеров был производён в биотехнологической компании «Евроген» (Москва, Россия).

Полимеразную цепную реакцию производили с использованием набора для проведения ПЦР Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) на амплификаторе T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: 95 °C – 3 мин, (95°C – 30 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин) – 34 раза, 72 °C – 5 мин. Анализ продуктов реакции производили методом гель-электрофореза ДНК в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в

концентрации 0,5 мкг/мл в буфере TBE в камерах Sub-Cell® GT (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием источника тока PowerPac™ Universal (Bio-Rad Laboratories, США) при напряженности электрического поля 3,5-4 В/см. Подвижность пробы в геле оценивали по подвижности красителей, содержащихся в буфере для проведения реакции, предоставляемом производителем. Анализ агарозных гелей после проведения гелевого электрофореза производили на анализаторе GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, США).

2.6.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для оценки возможных изменений последовательности ДНК в районе мишени (короткие делеции, инсерции) в случае *slc6a4b* использовали ПЦР в реальном времени. В качестве праймеров были взяты последовательность одного из олигонуклеотидов, синтезированного для создания вставки в плазмиде, соответствующего мишени – SertB guide 1 F: CACCGATCTGTTATCAAAACGGCGG и SERTB primer 1 R: AAATTTTCAGACGGCACTTTGAG. В качестве контрольной матрицы амплифицировали фрагмент 13 экзона гена *slc6a4a* (праймеры SERTA primer 13 F: GACACTTCTTTGAAGCTGAGCA и SERTA primer 13 R: TGTGTTTGTGCTACATGTCCAG).

Наша идея состояла в том, что при отсутствии сайта отжига праймера SertB guide 1 F или ухудшения условий для его посадки даже в случае гетерозиготы соотношение количество продукта амплификации участка гена *slc6a4b* к продукту *slc6a4a* будет падать по сравнению с контролем дикого типа. При снижении эффективности отжига праймера вследствие очень коротких делеций (2-3 нуклеотида) это будет наиболее заметно выражаться при повышении температуры отжига выше оптимальной: для этого реакцию для гена *slc6a4b* проводили при двух температурах – 58 °C (оптимальная) и 68 °C (жесткие условия). При обеих температурах реакция идет в случае дикого типа. Для амплификации продукта с гена *slc6a4a* температура отжига праймеров составляла 60°C.

Реакцию проводили при помощи набора для ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch™ (BioRad Laboratories, США). Анализ данных производили при помощи программы CFX Manager™ (BioRad Laboratories, США) по программе 95 °C – 3 мин, (95 °C – 30 с, 68/60/58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с) – 50 раз.

2.6.4. Подготовка к секвенированию участков генов интереса

Фрагменты ДНК для секвенирования амплифицировали при помощи высокоточной полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) на

амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) с использованием специфичных к конкретному гену интереса праймеров, используемых для генотипирования (рассмотрены выше), и праймеров SertA_1ex_upstream: CTGTTCCACCCCTTAACCCC и SertA_1ex_downstream: TAGCTGTTGATTGAGCGGCA, охватывающих более протяженный участок гена *slc6a4a*. Конечная концентрация праймеров составляла 0,4 мкМ. Реакцию проводили по следующей программе: 98 °C – 3 мин, (98 °C – 15 с, 67°C – 15 с, 72°C – 20-30 с (в зависимости от размера фрагмента) – 34-36 раз, 72 °C – 5 мин.

Нужные фрагменты выделяли из агарозного геля путем электрофоретического переноса ДНК в 20% (по массе) раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) в используемом для электрофореза буфере с последующим переосаждением ДНК из этого раствора при помощи этилового спирта. Процедура заключается в том, что под интересующим нас фрагментом в геле вырезали прямоугольную лунку, убирали из неё буфер и наносили 20% раствор ПЭГ. Затем напряжение повышали до 100-120 В и проводили электрофорез в таких условиях до тех пор, пока ДНК не войдет в раствор ПЭГ, который можно легко отобрать микропипеткой.

Очищенные продукты кинировали полинуклеотидкиназой фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США) (реакцию проводили в лигазном буфере) 25 минут при 37 °C и инактивировали фермент 10 минут при 75 °C. Затем лигировали лигазой фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США) по тупым концам в вектор pBluescript II SK+, предварительно обработанный эндонуклеазой рестрикции EcoRV (Eco32I) (Thermo Fisher Scientific, США) и дефосфорилированный согласно инструкции производителя термочувствительной фосфатазой FastAP (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию лигирования проводили либо 1 час при 22 °C, либо в течение ночи при 4-8°C. Полученной смесью трансформировали химически компетентных *E. coli* штамма XL1-Blue и высевали бактерий на чашки с твердой средой 2YT и 100 мг/л ампициллина.

Бактерий, содержащих плазмиду со вставкой, отбирали при помощи ПЦР с колоний с использованием набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) и праймеров M13dirL: GTTGTAACGACGGCCAGTG и T3_promoter_exact: CGCGCAATTAACCCTCACTAAAG, фланкирующих последовательность полилинкера, по программе 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин 15 с) – 34 раза, 72 °C – 5 мин. Индивидуальные колонии бактерий снимали с поверхности среды стерильным 200-микролитровым носом для микропипетки, окунали её в смесь для ПЦР, затем нос

сбрасывали в пробирку с 3 мл жидкой среды 2YT и 200 мг/л ампициллина и наращивали культуру на качалке при 37 °C и 300 об./мин.

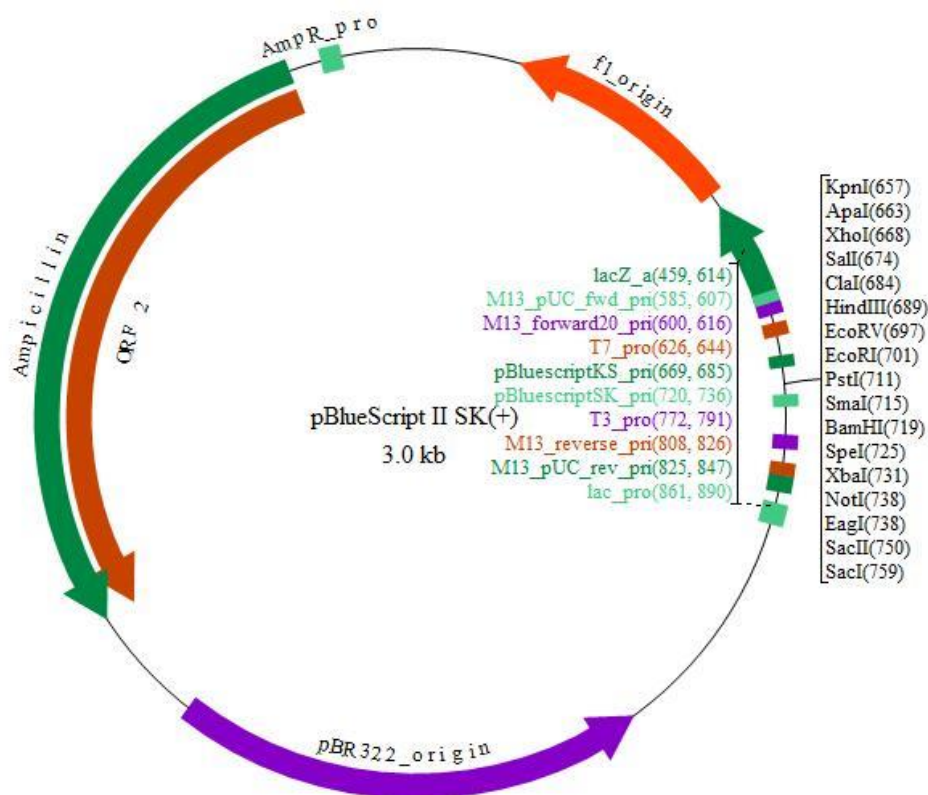


Рисунок 6. Карта плазмиды pBlueScript II SK (+).

Источник: [http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pBlueScript_II_SK\(+\).htm](http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pBlueScript_II_SK(+).htm) (дата обращения: 04.04.2018). Ampicillin – ген устойчивости к ампициллину.

В случае наличия вставки размер амплифицируемого фрагмента должен составлять около 200 п.н. + длина вставки. Анализ продуктов производили при помощи электрофореза в агарозном геле. Из культур, для которых наличие вставки в плазмидах было подтверждено, выделяли плазмиды. Для каждого образца геномной ДНК рыб выделяли по 3 плазмиды.

Также для секвенирования использовали и непосредственно очищенные продукты ПЦР.

Секвенирование производили в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ с использованием праймеров SERTA primer 1 F: CTCCAATGGTTATCGCAGTACA и SERTB primer 1 R: AAATTTTCAGACGGCACTTTGAG.

2.7. Методы работы с РНК

2.7.1. Транскрипция РНК-гидов *in vitro*

ДНК-матрицы для транскрипции приготавливали при помощи ПЦР с использованием высокоточной полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве матрицы использовали плазмиды, содержащие последовательности РНК-гидов, получение которых описано выше, в концентрации до 10 нг/мкл. В качестве праймеров использовали последовательности, комплементарные этому участку, с промотором для РНК-полимеразы фага T7 на 5' конце (TTAATACGACTCACTATAGG): T7_SERTA_exon1_F, T7_SERTA_exon13_F, T7_SERTB_exon1_F, T7_SERTB_exon12_F и праймер hairpin reverse (см. Табл 1.). Реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) по следующей программе: 98 °C – 2 мин, (98 °C – 7 с, 72 °C – 12 с) – 25 раз. Полученные фрагменты имели размер ~110 п.н. Матрицы для транскрипции очищали от компонентов реакционной смеси выделением из агарозного геля путем электрофоретического переноса ДНК в 20% раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Транскрипцию проводили при помощи набора HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, США) 16 часов при температуре 37 °C. После реакции транскрипции производили обработку проб ДНКазой I (New England Biolabs, США) 15 минут при 37 °C для устранения ДНК-матрицы из раствора. Очистку РНК от компонентов реакционной смеси производили по протоколу фенол-хлороформенной экстракции, предоставляемой производителем набора для транскрипции. Все манипуляции с РНК производили в условиях помещения, специально предназначенного для работы с РНК.

2.7.2. Денатурирующий электрофорез РНК в агарозном геле

Для предотвращения контаминации РНКазами и разрушения образца РНК необходимы определенные меры предосторожности при приготовлении к работе растворов и лабораторной посуды. Воду инкубировали в течение ночи с ингибитором рабонуклеаз диэтилпирокарбонатом (DEPC) в концентрации 0,05%, затем автоклавировали 30 минут для разрушения следов DEPC. Стеклянную посуду непосредственно перед использованием выдерживали в сухожаровом шкафу при 250 °C в течение ночи (хотя в нашем случае не была замечена разница в количестве РНК в подобном аналитическом электрофорезе при использовании промытой стерильной водой посуды).

В пробы РНК добавляли буфер для денатурации, содержащий формамид, в соотношении 2:1 к объему пробы и инкубировали 5 минут при 65 °C. Затем добавляли 2 мкл стандартного буфера для нанесения нуклеиновых кислот. Для проведения электрофореза

использовали 2% агарозный гель с формальдегидом на буфере MOPS. Электрофорез проводили в буфере MOPS при 5 В/см с префорезом в тех же условиях в течение 10 минут перед нанесением проб. Все концентрации реагентов в растворах соответствуют протоколу денатурирующего электрофореза РНК в агарозном геле из RNA Analysis Notebook (Promega, США), дата обращения 30.03.2018: <https://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/rna-analysis-notebook-retired/>.

Точную концентрацию РНК в пробах устанавливали при помощи спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

3. Результаты

3.1. Конструирование плазмид для технологии CRISPR/Cas9

В ходе работы были подобраны потенциальные мишени в генах *slc6a4a* и *slc6a4b* с целью получить протяженные делеции обоих генов (с 1 по 13 экзон у *slc6a4a* (9 тыс. п.н.) и с 1 по 12 экзон у *slc6a4b* (16 тыс. п.н.) (см. Табл 2).

Подбор производили с учетом минимизации возможных нецелевых эффектов и нарушения функции других генов. В качестве вектора для экспрессии РНК-гидов и нуклеазы Cas9 была выбрана специальная плаزمида PX458 (см. рис. 3). Она содержит гены *cas9*, *egfp* под контролем промотора бета-актина курицы, которые транскрибируются единой мРНК, транслируемой в виде двух отдельных пептидов. Также она имеет находящийся под контролем промотора U6 участок, состоящий из последовательности гибридной шпильки РНК-гида и участка с двумя сайтами узнавания рестриктазы BbsI, размещенными так, что после рестрикции плазмиды данным ферментом в неё можно лигировать необходимую нам последовательность для синтеза РНК-гида. При этом BbsI создает при разрезании ДНК липкие концы, некомплементарные друг другу, что позволяет ориентировать вставляемый фрагмент. Таким образом мы получаем полноценную матрицу для транскрипции РНК-гида и мРНК Cas9 непосредственно в клетке.

Для конструирования таких векторов мы сначала получили короткие фрагменты двухцепочечной ДНК (дуплекс образуют 20-21 нуклеотид) с липкими концами (рис. 7), с которых должны экспрессироваться участки РНК-гидов, непосредственно комплементарные мишеням. Для этого мы отождили два частично комплементарных олигонуклеотида друг на друга. Затем мы произвели рестрикцию плазмиды PX458 рестриктазой BbsI. В линеаризованные плазмиды при помощи лигазной реакции вносили получившиеся фрагменты двухцепочечной ДНК с липкими концами.

В конечном итоге мы получили лигазные смеси для 4 конструкций, потенциально содержащие правильно собранные плазмиды. Мы произвели трансформацию бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue и с получившихся чашек с питательной средой отобрали по 3 колонии для каждого вектора, дали им номера от 1 до 3 и выделили из каждой из них по отдельности плазмидную ДНК.

Табл. 2. Последовательности мишеней в составе целевых генов и созданные на их основе последовательности олигонуклеотидов для создания вставок в плазмидах. Синим цветом выделены нуклеотиды, добавленные для образования липких концов, красным – нуклеотиды, добавленные для улучшения транскрипции последовательности с промотора U6.

Целевой ген	Экзон	Последовательность мишени (5'- 3')	Последовательности олигонуклеотидов для создания вставки в плазмиде (5'- 3')	Название плазмиды со вставкой
<i>slc6a4a</i>	1	GTCGGTCATCGGGTATGCAG	CACCGTCGGTCATCGGGTATGCAG AAACCTGCATACCCGATGACCGAC	A1
<i>slc6a4a</i>	13	GCTAAAGGGTATTACCCCCG	CACCGCTAAAGGGTATTACCCCCG AAACCGGGGGTAATACCCTTTAGC	A13
<i>slc6a4b</i>	1	ATCTGTTATCAAAACGGCGG	CACCGATCTGTTATCAAAACGGCGG AAACCCGCCGTTTTGATAACAGATC	B1
<i>slc6a4b</i>	12	AATTGGGATCCATATGAAGG	CACCGAATTGGGATCCATATGAAGG AAACCTTCATATGGATCCCAATT	B12



Рисунок 7. Схематическое изображение последовательностей, полученных для вставки в плазмиду PX458.

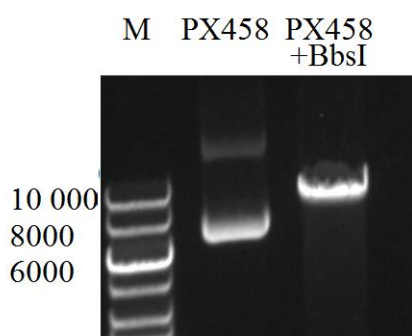


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов рестрикции плазмиды PX458 рестриктазой BbsI и контрольной плазмиды без рестрикции. Электрофоретическая подвижность линейризованной плазмиды отличается от подвижности интактной плазмиды до рестрикции. Это позволяет оценивать качество произведенной реакции.

Проверку наличия необходимой вставки осуществляли методом полимеразной цепной реакции, используя в качестве прямого праймера праймер, комплементарный участку в пределах промотора U6, а в качестве обратного – один из олигонуклеотидов, использовавшихся для создания самой вставки. Размер ожидаемого продукта составлял около 160 п.н. Таким образом, при отсутствии вставки в пределах плазмиды результат ПЦР должен быть негативным, и ожидаемый продукт не амплифицировался бы.

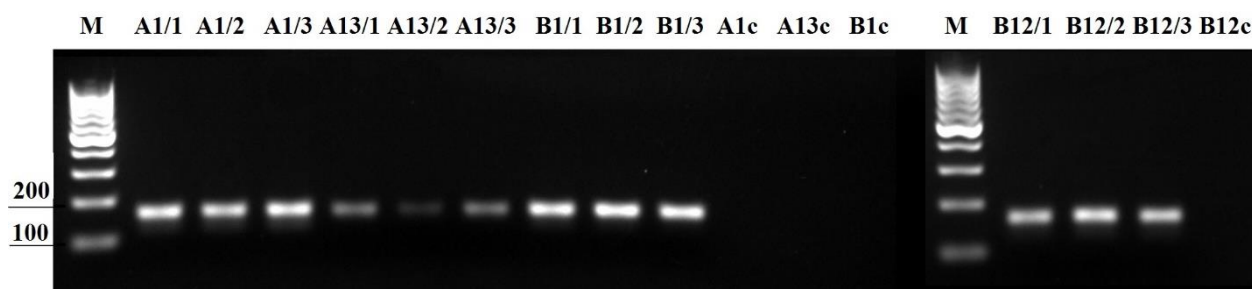


Рисунок 9. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР, произведенных для подтверждения наличия вставки в плазмидах PX458 (2% агароза, TBE). В названии плазмид буквы А и В отражают то, к мишени в гене какого из двух транспортеров относится вставка, затем отражен номер экзона в гене и номер отобранной колонии трансформантов. Образцы с пометкой «с» - контрольные образцы с различными парами праймеров без добавления ДНК.

Проверку методом ПЦР прошли все 12 выделенных плазмид, из них мы отобрали по 1 плазмиде для каждой мишени, для которых количество образовавшегося целевого ПЦР-продукта было визуально наибольшим исходя из результатов анализа методом геле-электрофореза в агарозном геле: это плазмиды A1/2, A13/1, B1/3, B12/2.

Данные плазмиды были отправлены на секвенирование, результаты которого окончательно подтвердили наличие вставок (см. рис. 10).

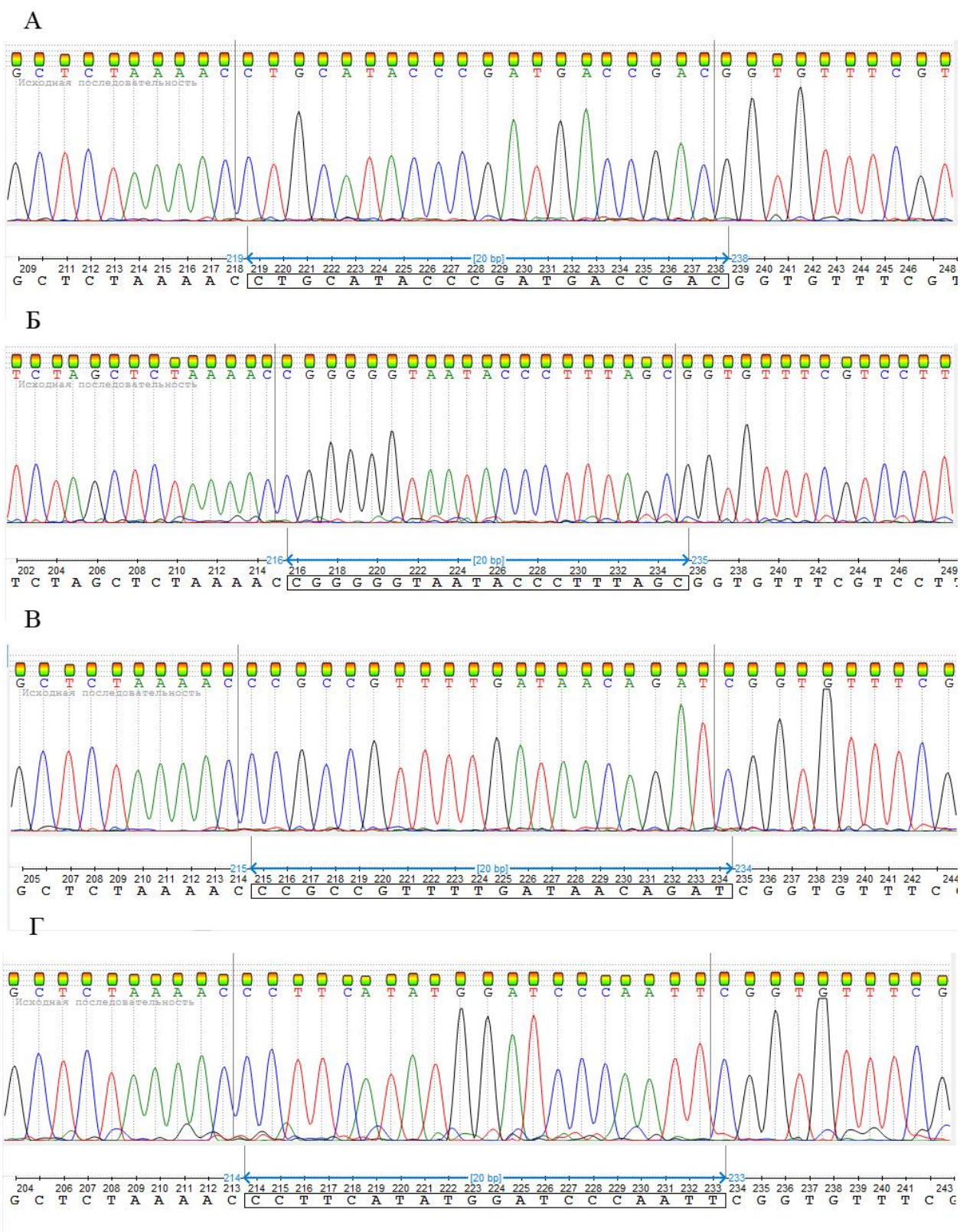


Рисунок 10. Результаты секвенирования плазмид. На хроматограммах выделены последовательности вставок, фланкируемые последовательностями плазмиды. А – плазмида А1/2, Б – плазмида А13/1, В – плазмида В1/3, Г – плазмида В12/2. Изображение получено в программе UGENE.

3.2. Микроинъекции плазмидной ДНК в икру *Danio rerio*

С ноября 2017 г. по март 2018 г. нами была отработана процедура скрещивания данио и проведены микроинъекции сконструированных плазмид в икру. Инъекции плазмид производили в следующих сочетаниях: A1 и A13, B1 и B12. Для каждого из двух вариантов было использовано примерно по 200 эмбрионов на ранних стадиях развития (наблюдаемый уровень смертности в пределах 50-70%).

Одной из задач, которую мы ставили перед собой, было не только отладить методику микроинъекций в икру, но и установить время начала (минуты после инъекции) экспрессии генов, которые несут плазмиды, и её окончания. Это важно для понимания, насколько критична задержка транскрипции генов инъецированных ДНК-конструкций.

Оценка времени начала экспрессии плазмид при помощи отбора эмбрионов, в которых после инъекции наблюдается флуоресценция EGFP, была отвергнута нами, так как заметное свечение появлялось только через сутки после инъекции, а отобранные в первом эксперименте эмбрионы вскоре погибли. Таким образом, позднее начало визуальной детекции EGFP не дало возможности оценить начало экспрессии генов, содержащихся на плазмиде.

Однако, важно, что был зафиксирован факт наличия экспрессии наших конструкций в эмбрионах.

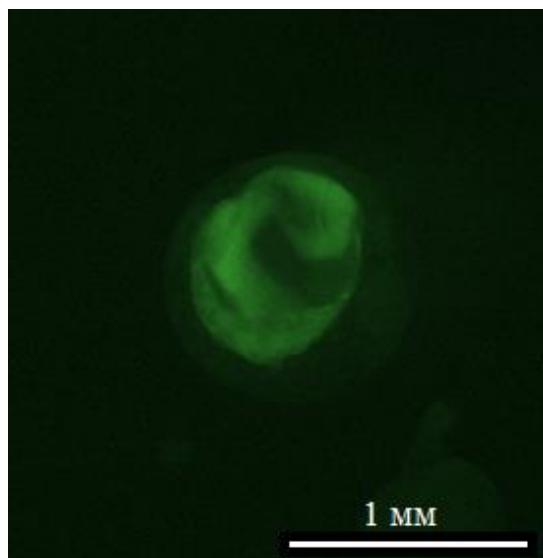


Рисунок 11. Флуоресценция EGFP в эмбрионе, инъецированном плазмидами A1 и A13, мишенью которых является ген *slc6a4a*, через сутки после укола. Изображение получено на флуоресцентном стереомикроскопе Leica M205 FA.

3.3. Генотипирование особей *Danio rerio* при помощи методов полимеразной цепной реакции и секвенирования ДНК

Для генотипирования рыб мы использовали мультиплексную ПЦР и ПЦР в реальном времени.

При разработанной нами схеме мультиплексной ПЦР аллели дикого типа, делеции и инверсии дают при проведении реакции различный набор ПЦР-продуктов, отличающихся длиной фрагментов (см. рис 5.). Дупликации также поддаются детекции при использовании подобной схемы, но в данной работе они не представляют для нас интереса.

Подтверждение работы праймеров было получено на 3 фенотипических формах данио (длиннохвостые (вуалевые) данио, леопардовые и короткохвостые), имеющих аллели генов *slc6a4a* и *slc6a4b* дикого типа.

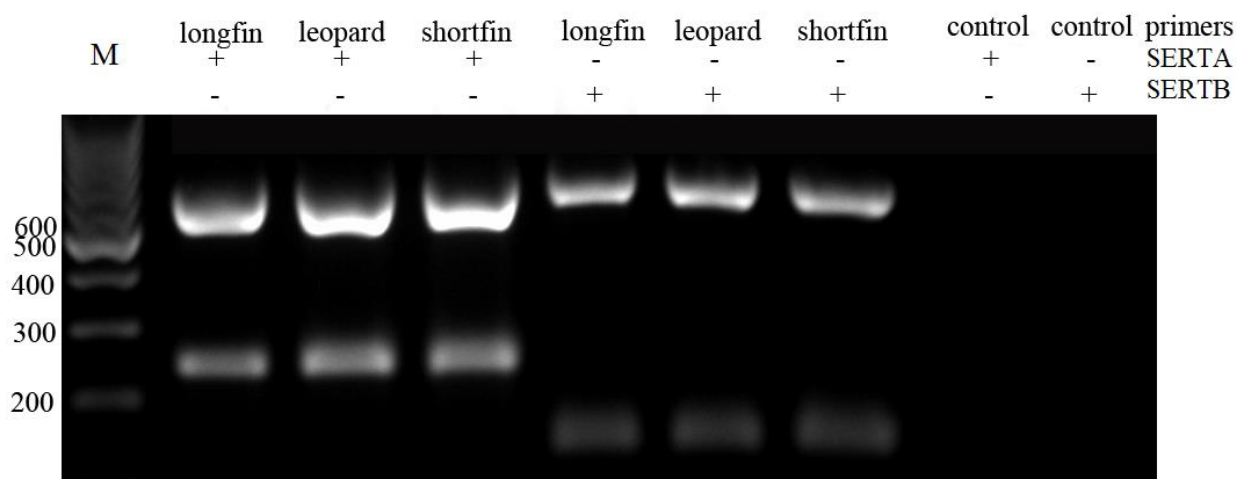


Рисунок 12. Электрофореграмма продуктов ПЦР, произведенных для генотипирования 3 различных форм *Danio rerio* по генам *slc6a4a* (продукт – белок SertA) и *slc6a4b* (продукт – белок SertB) (2% агароза, TBE). Longfin – длиннохвостая (вуалевая) форма данио, shortfin – короткохвостая, leopard – леопардовая, control – отрицательные контроли.

Через 4-5 недель после инъекции мы приступали к генотипированию выживших рыб.

Первые опыты с инъекциями плазмид A1 и A13 сопровождались стабильным отсутствием у некоторых рыб продукта ПЦР, амплифицируемого с участка первого экзона гена *slc6a4a*. Это вызвало у нас подозрение о наличии делеций в этом участке, из-за которых исчез один (или оба) из сайтов посадки праймеров.

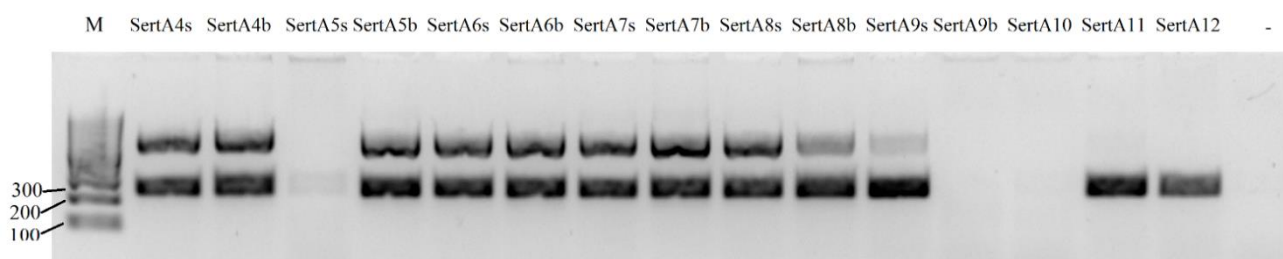


Рисунок 13. Электрофореграмма продуктов ПЦР генотипирования рыб, которые на ранних сроках развития получили инъекцию плазмид A1 и A13 (2% агароза, TBE). На изображении представлены не все проанализированные рыбы, подписи сверху указывают на наименования отдельных особей.

Для проверки этого предположения мы заказали дополнительные праймеры SertA_1ex_upstream и SertA_1ex_downstream, имеющие сайты посадки за пределами сайтов посадки предыдущей пары праймеров, т.е. охватывающие больший участок гена. Если отсутствие продукта вызвано делецией, то должен амплифицироваться продукт более короткий, чем ожидается согласно исходной последовательности. Но снова в некоторых случаях наблюдалось отсутствие продуктов реакции, а там, где они имелись, их размер соответствовал ожидаемому в случае отсутствия делеций.

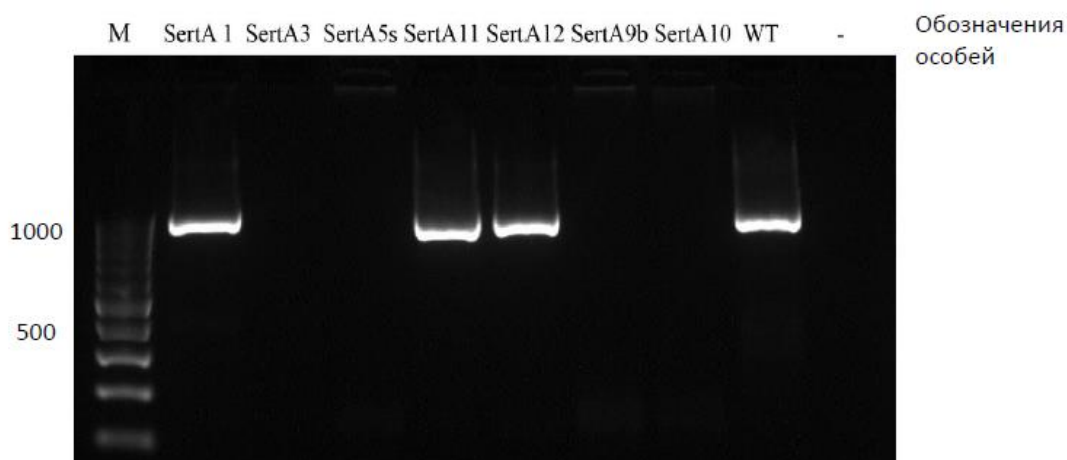


Рисунок 14. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием дополнительных праймеров, охватывающих более протяженный участок гена *slc6a4a*. В качестве матрицы использована геномная ДНК рыб, которые на ранних сроках развития получили инъекцию плазмид A1 и A13 (2% агароза, TBE).

Таким образом, причина отсутствия ожидаемых продуктов состояла в условиях проведения ПЦР. Как показывают наши последующие эксперименты, на наличие или отсутствие продуктов реакции в основном влияет количество взятой матрицы и сопутствующих ей примесей (продукт появляется при разбавлении раствора геномной ДНК

в 2-10 раз). Были взяты новые образцы тканей у тех же рыб, из них выделена геномная ДНК и её раствор разбавлен в 4 раза.

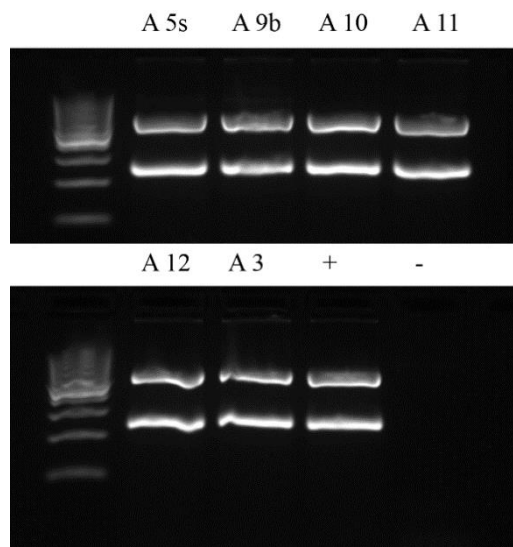


Рисунок 15. Электрофореграмма продуктов ПЦР генотипирования рыб, которые на ранних сроках развития получили инъекцию плазмид A1 и A13 (2% агароза, TBE), в качестве матрицы заново выделенная и разбавленная геномная ДНК. Все образцы соответствуют дикому типу.

Так как искомым изначально крупных делеций обнаружено не было, мы решили предпринять попытку выработать дополнительный способ обнаружения коротких делеций и/или инсерций в районе последовательности мишени без использования эндонуклеазы I фага T7.

Для этого мы применили ПЦР в реальном времени с использованием в качестве праймера последовательности, комплементарной выбранной мишени. К сожалению, эта методика не показала стабильного результата при анализе соотношения продуктов реакции при разной температуре отжига праймеров к контрольному продукту, а секвенирование проб, отобранных по этому показателю, не выявило никаких изменений в последовательности гена. Возможности испробовать эту методику на животных, достоверно гетерозиготных по делеции сайта посадки праймера, на данный момент не предоставилось.

Для нескольких рыб, отобранных для секвенирования интересующих нас участков генов (6 потенциальных мутантов и 1 особь дикого типа для *slc6a4a*, 4 потенциальных мутанта и 1 особь дикого типа для *slc6a4b*), были сконструированы векторы на основе

плазмиды pBluescript II SK+, содержащие вставку в виде фрагмента целевых генов (выделяли по 3 плазмиды для каждой рыбы).

Всего на данный момент проанализировано 18 особей после инъекции плазмид к *slc6a4a* и 36 - *slc6a4b*, из них секвенированы фрагменты первого экзона для 6 и 4 рыб, соответственно (отобранных в результате ПЦР), мутанты среди них не обнаружены.

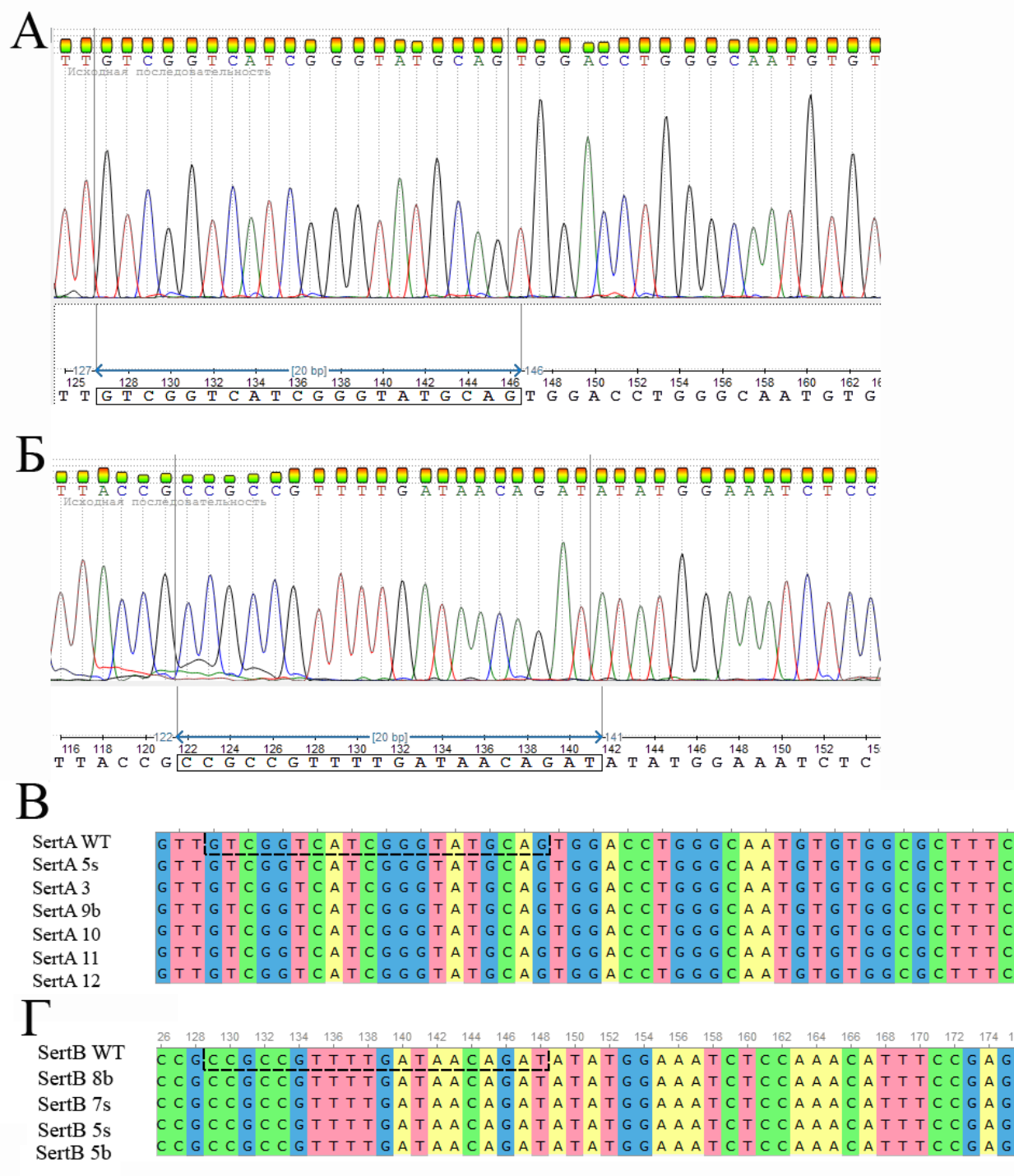


Рисунок 16. Результаты секвенирования ПЦР-продуктов, амплифицированных с первых экзонов исследуемых генов. А – ген *slc6a4a*, аллель дикого типа. На

хроматограмме выделена последовательность мишени; Б - ген *slc6a4b*, аллель дикого типа. На хроматограмме выделена последовательность мишени; В – выравнивание последовательностей в районе мишени в гене *slc6a4a* у нескольких отобранных после инъекции рыб ; Г - выравнивание последовательностей в районе мишени в гене *slc6a4b*.

3.4. Работа с РНК

Для проверки эффективности подобранных гидов и сравнения эффективности двух методик, мы приняли решение параллельно опытам с плазмидами произвести также инъекции смесей РНК-гидов и мРНК Cas9. Путем транскрипции *in vitro* с матрицы, находящейся под контролем промотора фага Т7, были получены 4 РНК-гида. После чего продукты реакции были очищены от ДНК и прочих компонентов реакционной смеси. Качество полученных РНК оценивали при помощи денатурирующего электрофореза РНК в агарозном геле. Концентрации РНК в растворах после проведения всех необходимых манипуляций и очистки составляли от 1400 нг/мкл до 1750 нг/мкл, что является достаточно хорошим результатом для столь коротких последовательностей (около 110 нуклеотидов).

Добавление бромистого этидия в агарозный гель (согласно выше указанному протоколу), а также инкубация геля в его растворе уже после проведения электрофореза сопровождаются сильным свечением под действием ультрафиолета не только рибонуклеиновых кислот, но и всего геля, что затрудняет анализ и фиксацию результатов. Однако, есть данные о том, что этого эффекта можно избежать, добавляя бромистый этидий непосредственно в пробы РНК перед нагреванием (Sambrook and Russell, 2001).

мРНК Cas9 была любезно предоставлена нам Еленой Ивановной Леоновой (ИТБМ).

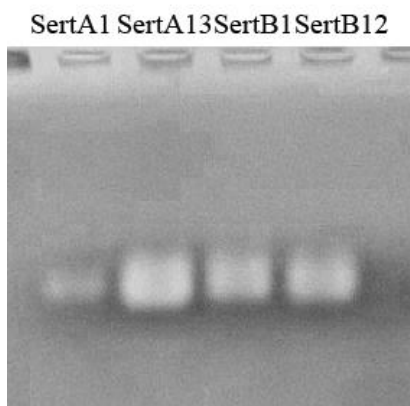


Рисунок 17. Электрофореграмма разделения РНК-гидов в агарозном геле в денатурирующих условиях. Подписи указывают на расположение мишеней РНК-гидов: название транспортера и конкретного экзона его гена.

Для сравнения мы также произвели электрофорез данных РНК в 2% агарозном геле без денатурирующих условий (использовали буфер TAE).

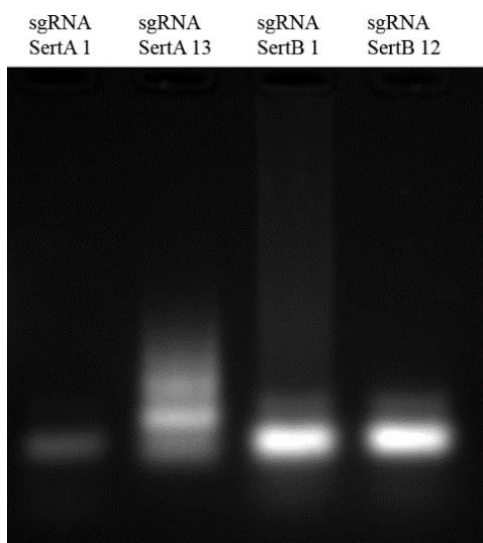


Рисунок 18. Электрофореграмма разделения РНК в 2% агарозном геле без нагревания проб и денатурирующих условий. На электрофореграмме видны образующиеся вторичные структуры РНК, осложняющие анализ. Подписи указывают на название транспортера и номер экзона в котором находится мишень данного РНК-гида.

В дальнейшем мы произвели инъекции в икру смесей мРНК Cas9 (300 нг/мкл) и РНК-гидов (по 50 нг/мкл). При инъекции больших объемов смеси происходила практически тотальная гибель эмбрионов на первые или вторые сутки, поэтому объем подбирали опытным путем, оценивая визуально количество вколотой смеси.

Обсуждение

В ходе данной работы был освоен ряд методик, которые необходимы для использования технологии CRISPR/Cas9. Несмотря на общую простоту этой технологии редактирования геномов, некоторые моменты в работе с ней могут сопровождаться определенными методическими сложностями.

Так, например, отладка методики микроинъекций в икру оказалась сопряженной с некоторыми трудностями, которые, в целом, вызваны фундаментальными различиями между эмбриональным развитием рыб и млекопитающих. С одной стороны, икра более крупная, чем, например, яйцеклетки мышей, но при этом имеет более плотные оболочки, которые сложнее проколоть. Оплодотворенная икра данио проходит развитие вне организма самки, но зато заготы крайне быстро дробятся. Инъекции оптимальны на 1-2-клеточной стадии и вообще имеют смысл только до 4-клеточной – то есть примерно в первые 30 минут после оплодотворения. Таким образом, время для проведения эффективных инъекций сильно ограничено, хотя процедура, по сравнению с грызунами, и облегчена тем, что не включает в себя имплантацию клеток в организм суррогатной матери. В ходе этой работы большая часть изложенных выше методических затруднений была преодолена, и мы наладили методику микроинъекций в оплодотворенную икру данио как плазмидной ДНК, так и РНК.

Ещё одной из проблем является трудность предсказания эффективности РНК-гидов *in vivo*. Ранее были проведены опыты по систематическому анализу последовательностей РНК-гидов для ряда генов зебраданио, а также существует большое количество работ, проведенных в основном на культурах клеток млекопитающих и других модельных организмах (Albadri, Del Bene et al., 2017). Однако, детальное сравнение эффективности гидов, предсказанной при помощи существующих алгоритмов, и их реальной эффективности в опыте демонстрирует особенно низкую степень совпадения этих параметров для данных, полученных на данио (Albadri, Del Bene et al., 2017; Haeussler, Schonig et al., 2016). Также, степень эффективности гида нельзя точно установить, даже тестируя его *in vitro* путем оценки эффективности разрезания амплифицированного при помощи ПЦР участка целевого гена, так как такой гид всё равно может оказаться слабо эффективным *in vivo*. Так и наоборот, гид, который работает хорошо *in vivo*, может оказаться абсолютно не работающим в системе *in vitro* (однако, как правило, неэффективный *in vitro* гид не работает и *in vivo*, что позволяет исключать такие гиды из анализа). Предполагается, что состояние хроматина в каждом конкретном локусе и в

определенное время может влиять на эффективность системы CRISPR/Cas9 (Albadri, Del Bene et al., 2017).

Для того, чтобы удостовериться, что использованные нами гиды обладают эффективностью *in vivo*, мы уже получили РНК-гиды и мРНК Cas9 и начали инъекции их смесей в эмбрионы данио на ранних стадиях развития. Этот опыт позволит нам как оценить эффективность гидов, так и, в случае их нормальной работы, сравнить эффективность двух методик (плазмидные векторы и РНК), а также отобрать мутантных особей для дальнейших экспериментов. Если же гиды окажутся неэффективными, будет необходимо выполнить выбор новых мишеней.

Одной из задач, которую мы планировали решить, было определение времени начала и окончания транскрипции генов на плазмиде в клетках эмбриона. Однако, флуоресценцию EGFP возможно было детектировать только спустя сутки после инъекции. Этот факт согласуется с данными, полученными на культурах клеток млекопитающих, где флуоресценцию обнаруживали спустя 16-24 часа после трансфекции (Zhang, Gurtu et al., 1996). Также, EGFP достаточно стабилен (период полужизни около 26 часов) (Corish and Tyler-Smith, 1999). Мы предполагаем, что для выполнения этой задачи можно использовать ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (для оценки времени появления транскрипта) и гибридизацию с антителами к EGFP или FLAG (на уровне наличия белкового продукта).

В нормальных условиях на начальных этапах развития транскрипция в эмбрионе не происходит, а для синтеза белков используются материнские мРНК, запасенные в желтке. Считается, что начало собственно зиготической транскрипции у данио имеет место во время 64-256-клеточных стадий (7-9 циклы деления) с транскрипции нескольких сотен генов и достигает нескольких тысяч перед началом гастрюляции (Lee, Bonneau et al., 2014). При этом, например, у мышей зиготическая транскрипция активно идет уже на 2-клеточной стадии (Lee, Bonneau et al., 2014).

Однако, мы имели основания предполагать, что транскрипция генов, содержащихся на плаزمиде, должна начинаться раньше, чем переход к зиготической транскрипции. В опытах Ньюпорта и Киршнера было показано, что микроинъекция плазмиды, содержащей дрожжевой ген тРНК, в оплодотворенные яйцеклетки *Xenopus laevis* вызывает синтез этой РНК всего через 10 минут после инъекции, задолго до начала зиготической транскрипции (Newport and Kirschner, 1982). Однако, в дальнейшем экспрессия плазмиды была репрессирована и возобновлялась только в поздней бластуле.

Похожие результаты были получены в опытах на мышах (Wiekowski, Miranda et al., 1993) и данио (Harvey, Sealy et al., 2013). Например, после инъекции в оплодотворенные яйцеклетки данио плазмиды, содержащей кодирующую последовательность CFP (cyan fluorescent protein, голубой флуоресцентный белок) под контролем промотора EF1 α (эукариотического фактора элонгации 1 α), транскрипция репортерного гена была детектирована через час после укола примерно на 16-клеточной стадии развития эмбриона (Harvey, Sealy et al., 2013). Однако, не ясно, в какой момент CFP становится детектируемым на белковом уровне, так как исследователи изучают только наличие транскрипта, используя ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции, но не анализируют течение трансляции. Также в анализ взяты только эмбрионы через 1 час после инъекции, и нет данных, есть ли искомый транскрипт до этого момента, и когда транскрипция снова «замолкает».

Эти данные указывают на то, что многие компоненты транскрипционного комплекса уже готовы к работе в ранних эмбрионах, и они способны транскрибировать «голую» плазмидную ДНК, при этом структура хроматина сохраняет геномную ДНК недоступной для транскрипции (Lee, Vonneau et al., 2014). Это означает, что транскрипция чужеродных генов возможна в зиготе даже на самых ранних стадиях.

Подтверждение этому мы наблюдали на примере эмбрионов с наличием в клетках EGFP, ген которого находился именно на плаزمиде. Более того, флуоресценцию можно было наблюдать в большом количестве клеток эмбрионов, в которых её детектировали. Это означает, во-первых, что плазмиды действительно попадали из желтка, куда проводили их инъекции, в ядра клеток зародыша (ведь именно там возможна транскрипция). Во-вторых, синтез EGFP происходил одновременно во многих клетках, а часть плазмид могла сохраняться в ядрах после их деления и передаваться новым клеткам зародыша, вплоть до окончательной их потери. Учитывая, что в культурах клеток EGFP становится детектируемым только через 16-24 часа после трансфекции, мы можем выдвинуть осторожное предположение, что в нашем случае его синтез шел в течение первых суток, как и синтез нуклеазы Cas9. Однако точное время начала транскрипции генов, содержащихся на плазмиде, установить пока не удалось.

Элиминация чужеродной ДНК в зиготах начинает активно происходить во время гастрюляции, но в случае линейной ДНК часть молекул может переживать стадию гастрюлы и даже интегрировать в геном (Stuart, McMurray et al., 1988). Однако, предоставление ДНК в кольцевой форме снижает вероятность встраивания в геном, таким образом обеспечивая транзиентность экспрессии трансгена (Mashiko, Fujihara et al., 2013).

То есть, нет принципиальных возражений против возможности кратковременной экспрессии экзогенной ДНК и дальнейшей потери плазмиды клетками зародыша. Мы действительно детектировали экспрессию плазмидных генов благодаря флуоресценции EGFP. Однако, что является одной из существенных проблем, в результате могут развиваться крайне мозаичные по целевой мутации особи (как, например, в аналогичной работе с *Drosophila melanogaster* (Gratz, Cummings et al., 2013).

Отбор инъектированных плазмидой эмбрионов при помощи детекции EGFP был отвергнут нами, так как в пилотном опыте мальки, отобранные по наличию флуоресценции через сутки после инъекции, погибли через несколько дней. Вероятно, что необходимо вернуться к этому варианту отбора и обратить пристальное внимание на то, действительно ли все эмбрионы с достоверной экспрессией генов, содержащихся на плазмиде, гибнут, или же наблюдаемый в первом опыте эффект был вызван какими-то сторонними факторами.

Согласно результатам экспериментов с *Drosophila melanogaster* даже постоянная экспрессия Cas9 не влияла значимо на уровень смертности особей (Gantz and Bier, 2015). Это даже позволило разработать метод под названием мутагенная цепная реакция, основанный на интегрировании конструкции, кодирующей Cas9 и РНК-гиды, в геном. Из этого следует, что слишком длительная экспрессия Cas9, вероятно, не должна была нарушить жизнеспособность эмбрионов, однако это положение требует экспериментального доказательства.

Мы также начали процедуру генотипирования по генам транспортеров серотонина особей, полученных в ходе эксперимента, при помощи методов ПЦР и секвенирования отдельных участков генов. Нам пока не удалось обнаружить мутантных по выбранным генам особей *Danio rerio*, однако на данный момент проанализировано менее трети полученных рыб. В дальнейшем мы планируем продолжить анализ рыб, полученных в экспериментах с инъекциями плазмид, а также провести повторный отбор эмбрионов по флуоресценции EGFP. Параллельно работам с плазмидами мы собираемся провести анализ эффективности выбранных нами РНК-гидов и затем сравнить два эти подхода к использованию технологии CRISPR/Cas9 по их относительной эффективности.

Выводы

1. Освоены методы, необходимые для использования технологии CRISPR/Cas9 на *Danio rerio* (работа с плазмидами, микроинъекции ДНК- и РНК-конструкций в икру, транскрипция *in vitro* и дальнейшая работа с РНК, генотипирование особей методами ПЦР и секвенирования участков генов и т.д.).
2. Сконструированы векторы на основе плазмиды PX458 для внесения изменений в гены транспортеров серотонина у данио. Экспериментально подтверждено, что они содержат необходимые последовательности.
3. Гены, содержащиеся на плазмиде, экспрессируются *in vivo* в живых эмбрионах данио.
4. Анализ особей после инъекции созданных генетических конструкций в оплодотворенную икру пока не обнаружил крупных делеций или других нарушений последовательности генов транспортеров серотонина.

Благодарности

Хочу принести благодарность моему научному руководителю Людмиле Андреевне Мамон за ценные замечания и помощь при подготовке текста этой работы и докладов; научному консультанту Дарье Андреевне Мешалкиной за помощь в планировании и проведении исследования, методические советы и замечания во время проведения опытов и написания текста работы. Также выражаю благодарность Елене Ивановне Леоновой за предоставление плазмид и мРНК Cas9 и ценные советы по проведению микроинъекций, Андрею Сергеевичу Герасимову за методические советы и предоставление материалов. Огромная благодарность Егору Борисовичу Малашичеву, Анне Борисовне Вольновой, коллективу вивария НМИЦ им. В. А. Алмазова, коллективам Лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии ИТБМ СПбГУ во главе с Раулем Радиковичем Гайнетдиновым и Лаборатории биологической психиатрии ИТБМ СПбГУ во главе с Аланом Валерьевичем Калугевым и сотрудникам Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за предоставление материальной базы и оборудования для проведения этого исследования и всяческую помощь и поддержку. Также благодарю Елену Николаевну Толкунову за рецензирование данной работы.

Список использованной литературы

1. Abreu M.S., Koakoski G., Ferreira D., Oliveira T.A., Rosa J.G., Gusso D., Giacomini A.C., Piatto A.L., Barcellos L.J. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish // PLoS One. 2014. T. 9. № 7. — C. e103232.
2. Albadri S., Del Bene F., Revenu C. Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish // Methods. 2017. T. 121-122. — C. 77-85.
3. Alsop D., Vijayan M.M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008. T. 294. № 3. — C. R711-9.
4. Amsterdam A., Hopkins N. Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish // Methods Cell Biol. 2004. T. 77. — C. 3-20.
5. Arango V., Underwood M.D., Mann J.J. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide // Prog Brain Res. 2002. T. 136. — C. 443-53.
6. Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines // Genome Biol. 2015a. T. 16. — C. 247.
7. Barrangou R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond // Curr Opin Immunol. 2015b. T. 32. — C. 36-41.
8. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // Science. 2007. T. 315. № 5819. — C. 1709-12.
9. Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9 // J Vis Exp. 2015. № 95. — C. e52118.
10. Bengel D., Greenberg B.D., Cora-Locatelli G., Altemus M., Heils A., Li Q., Murphy D.L. Association of the serotonin transporter promoter regulatory region polymorphism and obsessive-compulsive disorder // Mol Psychiatry. 1999. T. 4. № 5. — C. 463-6.
11. Berger M., Gray J.A., Roth B.L. The expanded biology of serotonin // Annu Rev Med. 2009. T. 60. — C. 355-66.
12. Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // Annu Rev Genet. 2011. T. 45. — C. 273-97.
13. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology. 2005. T. 151. № Pt 8. — C. 2551-61.

14. Brooks A.K., Gaj T. Innovations in CRISPR technology // *Curr Opin Biotechnol.* 2018. T. 52. — C. 95-101.
15. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science.* 2008. T. 321. № 5891. — C. 960-4.
16. Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break // *Trends Cell Biol.* 2016. T. 26. № 1. — C. 52-64.
17. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat Biotechnol.* 2013. T. 31. № 3. — C. 230-2.
18. Clark K.J., Boczek N.J., Ekker S.C. Stressing zebrafish for behavioral genetics // *Rev Neurosci.* 2011. T. 22. № 1. — C. 49-62.
19. Corish P., Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells // *Protein Eng.* 1999. T. 12. № 12. — C. 1035-40.
20. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature.* 2011. T. 471. № 7340. — C. 602-7.
21. DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems // *Nucleic Acids Res.* 2013. T. 41. № 7. — C. 4336-43.
22. Driever W., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Neuhauss S.C., Malicki J., Stemple D.L., Stainier D.Y., Zwartkruis F., Abdelilah S., Rangini Z., Belak J., Boggs C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish // *Development.* 1996. T. 123. — C. 37-46.
23. Duan H., Wang J. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3 // *J Pharmacol Exp Ther.* 2010. T. 335. № 3. — C. 743-53.
24. Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., Elkhayat S.I., Bartels B.K., Tien A.K., Tien D.H., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z., Kalueff A.V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish // *Behav Brain Res.* 2009. T. 205. № 1. — C. 38-44.
25. Ellis L.D., Soo E.C., Achenbach J.C., Morash M.G., Soanes K.H. Use of the zebrafish larvae as a model to study cigarette smoke condensate toxicity // *PLoS One.* 2014. T. 9. № 12. — C. e115305.

26. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. T. 391. № 6669. — C. 806-11.
27. Friedland A.E., Tzur Y.B., Esvelt K.M., Colaiacovo M.P., Church G.M., Calarco J.A. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system // *Nat Methods*. 2013. T. 10. № 8. — C. 741-3.
28. Gantz V.M., Bier E. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations // *Science*. 2015. T. 348. № 6233. — C. 442-4.
29. Garst A.D., Bassalo M.C., Pines G., Lynch S.A., Halweg-Edwards A.L., Liu R., Liang L., Wang Z., Zeitoun R., Alexander W.G., Gill R.T. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering // *Nat Biotechnol*. 2017. T. 35. № 1. — C. 48-55.
30. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. T. 109. № 39. — C. E2579-86.
31. Gerlai R. Antipredatory behavior of zebrafish: adaptive function and a tool for translational research // *Evol Psychol*. 2013. T. 11. № 3. — C. 591-605.
32. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes // *Cell*. 2013. T. 154. № 2. — C. 442-51.
33. Goldman N., Gleit D.A., Lin Y.H., Weinstein M. The serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR): allelic variation and links with depressive symptoms // *Depress Anxiety*. 2010. T. 27. № 3. — C. 260-9.
34. Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K., Harrison M.M., Wildonger J., O'Connor-Giles K.M. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease // *Genetics*. 2013. T. 194. № 4. — C. 1029-35.
35. Green J., Collins C., Kyzar E.J., Pham M., Roth A., Gaikwad S., Cachat J., Stewart A.M., Landsman S., Grieco F., Tegelenbosch R., Noldus L.P., Kalueff A.V. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior // *J Neurosci Methods*. 2012. T. 210. № 2. — C. 266-71.
36. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007a. T. 8. — C. 172.

37. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *Nucleic Acids Res.* 2007b. T. 35. № Web Server issue. — C. W52-7.
38. Haddley K., Bubb V.J., Breen G., Parades-Esquivel U.M., Quinn J.P. Behavioural genetics of the serotonin transporter // *Curr Top Behav Neurosci.* 2012. T. 12. — C. 503-35.
39. Haeussler M., Schonig K., Eckert H., Eschstruth A., Mianne J., Renaud J.B., Schneider-Maunoury S., Shkumatava A., Teboul L., Kent J., Joly J.S., Concordet J.P. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR // *Genome Biol.* 2016. T. 17. № 1. — C. 148.
40. Haffter P., Nusslein-Volhard C. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish // *Int J Dev Biol.* 1996. T. 40. № 1. — C. 221-7.
41. Hammerschmidt M., Blader P., Strahle U. Strategies to perturb zebrafish development // *Methods Cell Biol.* 1999. T. 59. — C. 87-115.
42. Harvey S.A., Sealy I., Kettleborough R., Fenyes F., White R., Stemple D., Smith J.C. Identification of the zebrafish maternal and paternal transcriptomes // *Development.* 2013. T. 140. № 13. — C. 2703-10.
43. Herculano A.M., Maximino C. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: towards a paradox // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014. T. 55. — C. 50-66.
44. Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity // *Toxicol Sci.* 2005. T. 86. № 1. — C. 6-19.
45. Horvath P., Romero D.A., Coute-Monvoisin A.C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus* // *J Bacteriol.* 2008. T. 190. № 4. — C. 1401-12.
46. Houwing D.J., Buwalda B., van der Zee E.A., de Boer S.F., Olivier J.D.A. The Serotonin Transporter and Early Life Stress: Translational Perspectives // *Front Cell Neurosci.* 2017. T. 11. — C. 117.
47. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J.C., Koch R., Rauch G.J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L.T., Guerra-Assuncao J.A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J.H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S.F., Laird G.K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Willey D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliot D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Begum S., Mortimore B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark

- S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Lloyd C., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthravadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley C.M., Ersan-Urun Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberlander M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Lanz C., Raddatz G., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Schuster S.C., Carter N.P., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle S.M., Enright A., Geisler R., Plasterk R.H., Lee C., Westerfield M., de Jong P.J., Zon L.I., Postlethwait J.H., Nusslein-Volhard C., Hubbard T.J., Roest Crollius H., Rogers J., Stemple D.L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome // *Nature*. 2013. T. 496. № 7446. — C. 498-503.
48. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // *Nat Biotechnol*. 2013. T. 31. № 9. — C. 827-32.
 49. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.R. Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system // *PLoS One*. 2013a. T. 8. № 7. — C. e68708.
 50. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.R., Joung J.K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system // *Nat Biotechnol*. 2013b. T. 31. № 3. — C. 227-9.
 51. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. T. 96. № 1. — C. 23-8.
 52. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // *J Bacteriol*. 1987. T. 169. № 12. — C. 5429-33.
 53. Jao L.E., Wente S.R., Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. T. 110. № 34. — C. 13904-9.

54. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems // *Nat Biotechnol.* 2013. T. 31. № 3. — C. 233-9.
55. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science.* 2012. T. 337. № 6096. — C. 816-21.
56. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells // *Elife.* 2013. T. 2. — C. e00471.
57. Kalueff A.V., Olivier J.D., Nonkes L.J., Homberg J.R. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes // *Neurosci Biobehav Rev.* 2010. T. 34. № 3. — C. 373-86.
58. Kato T., Hara S., Goto Y., Ogawa Y., Okayasu H., Kubota S., Tamano M., Terao M., Takada S. Creation of mutant mice with megabase-sized deletions containing custom-designed breakpoints by means of the CRISPR/Cas9 system // *Sci Rep.* 2017. T. 7. № 1. — C. 59.
59. Kelly A., Hurlstone A.F. The use of RNAi technologies for gene knockdown in zebrafish // *Brief Funct Genomics.* 2011. T. 10. № 4. — C. 189-96.
60. Kim E., Koo T., Park S.W., Kim D., Kim K., Cho H.Y., Song D.W., Lee K.J., Jung M.H., Kim S., Kim J.H., Kim J.H., Kim J.S. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* // *Nat Commun.* 2017. T. 8. — C. 14500.
61. Kok F.O., Shin M., Ni C.W., Gupta A., Grosse A.S., van Impel A., Kirchmaier B.C., Peterson-Maduro J., Kourkoulis G., Male I., DeSantis D.F., Sheppard-Tindell S., Ebarasi L., Betsholtz C., Schulte-Merker S., Wolfe S.A., Lawson N.D. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish // *Dev Cell.* 2015. T. 32. № 1. — C. 97-108.
62. Kreek M.J., Nielsen D.A., Butelman E.R., LaForge K.S. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction // *Nat Neurosci.* 2005. T. 8. № 11. — C. 1450-7.
63. Kunin V., Sorek R., Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats // *Genome Biol.* 2007. T. 8. № 4. — C. R61.
64. Kysil E.V., Meshalkina D.A., Frick E.E., Echevarria D.J., Rosemberg D.B., Maximino C., Lima M.G., Abreu M.S., Giacomini A.C., Barcellos L.J.G., Song C., Kalueff A.V. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests // *Zebrafish.* 2017. T. 14. № 3. — C. 197-208.
65. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms // *Nat Rev Microbiol.* 2010. T. 8. № 5. — C. 317-27.

66. Lee M.T., Bonneau A.R., Giraldez A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition // *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014. T. 30. — C. 581-613.
67. Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P., Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells // *Nat Biotechnol.* 2002. T. 20. № 5. — C. 500-5.
68. Lesch K.P., Merschdorf U. Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective // *Behav Sci Law.* 2000. T. 18. № 5. — C. 581-604.
69. Lesch K.P., Zeng Y., Reif A., Gutknecht L. Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway // *Eur J Pharmacol.* 2003. T. 480. № 1-3. — C. 185-204.
70. Liu J., Zhou Y., Qi X., Chen J., Chen W., Qiu G., Wu Z., Wu N. CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling // *Hum Genet.* 2017. T. 136. № 1. — C. 1-12.
71. Ma S., Chang J., Wang X., Liu Y., Zhang J., Lu W., Gao J., Shi R., Zhao P., Xia Q. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori* // *Sci Rep.* 2014. T. 4. — C. 4489.
72. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action // *Biol Direct.* 2006. T. 1. — C. 7.
73. Makarova K.S., Koonin E.V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems // *Methods Mol Biol.* 2015. T. 1311. — C. 47-75.
74. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // *Nat Rev Microbiol.* 2015. T. 13. № 11. — C. 722-36.
75. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // *Science.* 2013. T. 339. № 6121. — C. 823-6.
76. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity // *Nature.* 2010. T. 463. № 7280. — C. 568-71.
77. Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA // *Sci Rep.* 2013. T. 3. — C. 3355.

78. Mashiko D., Young S.A., Muto M., Kato H., Nozawa K., Ogawa M., Noda T., Kim Y.J., Satouh Y., Fujihara Y., Ikawa M. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes // *Dev Growth Differ*. 2014. T. 56. № 1. — C. 122-9.
79. Mayden R.L., Tang K.L., Conway K.W., Freyhof J., Chamberlain S., Haskins M., Schneider L., Sudkamp M., Wood R.M., Agnew M., Bufalino A., Sulaiman Z., Miya M., Saitoh K., He S. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species // *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2007. T. 308. № 5. — C. 642-54.
80. McLaughlin D.P., Little K.Y., Lopez J.F., Watson S.J. Expression of serotonin transporter mRNA in human brainstem raphe nuclei // *Neuropsychopharmacology*. 1996. T. 15. № 5. — C. 523-9.
81. Meeker N.D., Hutchinson S.A., Ho L., Trede N.S. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues // *Biotechniques*. 2007. T. 43. № 5. — C. 610, 612, 614.
82. Menger G.J., Koke J.R., Cahill G.M. Diurnal and circadian retinomotor movements in zebrafish // *Vis Neurosci*. 2005. T. 22. № 2. — C. 203-9.
83. Meyer A., Malaga-Trillo E. Vertebrate genomics: More fishy tales about Hox genes // *Curr Biol*. 1999. T. 9. № 6. — C. R210-3.
84. Miller N., Gerlai R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*) // *Behav Brain Res*. 2007. T. 184. № 2. — C. 157-66.
85. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *J Mol Evol*. 2005. T. 60. № 2. — C. 174-82.
86. Murphy D.L., Fox M.A., Timpano K.R., Moya P.R., Ren-Patterson R., Andrews A.M., Holmes A., Lesch K.P., Wendland J.R. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems // *Neuropharmacology*. 2008. T. 55. № 6. — C. 932-60.
87. Musa A., Lehrach H., Russo V.A. Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development // *Dev Genes Evol*. 2001. T. 211. № 11. — C. 563-7.
88. Nakayama T., Fish M.B., Fisher M., Oomen-Hajagos J., Thomsen G.H., Grainger R.M. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis* // *Genesis*. 2013. T. 51. № 12. — C. 835-43.

89. Nasevicius A., Ekker S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish // *Nat Genet.* 2000. T. 26. № 2. — C. 216-20.
90. Nasiadka A., & Clark, M. D. . Zebrafish breeding in the laboratory environment // *ILAR J.* 2012. T. 53(2). — C. 161-168.
91. Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription // *Cell.* 1982. T. 30. № 3. — C. 687-96.
92. Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos // *Cell.* 2014. T. 156. № 4. — C. 836-43.
93. Norton W.H., Folchert A., Bally-Cuif L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain // *J Comp Neurol.* 2008. T. 511. № 4. — C. 521-42.
94. O'Geen H., Henry I.M., Bhakta M.S., Meckler J.F., Segal D.J. A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture // *Nucleic Acids Res.* 2015. T. 43. № 6. — C. 3389-404.
95. Oates A.C., Bruce A.E., Ho R.K. Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo // *Dev Biol.* 2000. T. 224. № 1. — C. 20-8.
96. Ohno S., Wolf U., Atkin N.B. Evolution from fish to mammals by gene duplication // *Hereditas.* 1968. T. 59. № 1. — C. 169-87.
97. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* 2012. T. 28. № 8. — C. 1166-7.
98. Panzica-Kelly J.M., Zhang C.X., Augustine-Rauch K. Zebrafish embryo developmental toxicology assay // *Methods Mol Biol.* 2012. T. 889. — C. 25-50.
99. Patton E.E., Zon L.I. The art and design of genetic screens: zebrafish // *Nat Rev Genet.* 2001. T. 2. № 12. — C. 956-66.
100. Pavlidis M., Theodoridi A., Tsalafouta A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio* // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015. T. 60. — C. 121-31.
101. Postlethwait J.H., Woods I.G., Ngo-Hazelett P., Yan Y.L., Kelly P.D., Chu F., Huang H., Hill-Force A., Talbot W.S. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes // *Genome Res.* 2000. T. 10. № 12. — C. 1890-902.

102. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 // *Nature*. 2015. T. 520. № 7546. — C. 186-91.
103. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat Protoc*. 2013. T. 8. № 11. — C. 2281-2308.
104. Ren G., Li S., Zhong H., Lin S. Zebrafish tyrosine hydroxylase 2 gene encodes tryptophan hydroxylase // *J Biol Chem*. 2013. T. 288. № 31. — C. 22451-9.
105. Ressler K.J., Nemeroff C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders // *Depress Anxiety*. 2000. T. 12 Suppl 1. — C. 2-19.
106. Robu M.E., Larson J.D., Nasevicius A., Beiraghi S., Brenner C., Farber S.A., Ekker S.C. p53 activation by knockdown technologies // *PLoS Genet*. 2007. T. 3. № 5. — C. e78.
107. Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. CRISPI: a CRISPR interactive database // *Bioinformatics*. 2009. T. 25. № 24. — C. 3317-8.
108. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning : a laboratory manual в 3 томах. 3rd — Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
109. Sander J.D., Joung J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes // *Nat Biotechnol*. 2014. T. 32. № 4. — C. 347-55.
110. Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system // *Nat Protoc*. 2014. T. 9. № 10. — C. 2395-410.
111. Sollu C., Pars K., Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Maeder M.L., Joung J.K., Heilbronn R., Cathomen T. Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion // *Nucleic Acids Res*. 2010. T. 38. № 22. — C. 8269-76.
112. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea // *Nat Rev Microbiol*. 2008. T. 6. № 3. — C. 181-6.
113. Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* // *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008. T. 83. № 1. — C. 13-34.
114. Spies M., Knudsen G.M., Lanzenberger R., Kasper S. The serotonin transporter in psychiatric disorders: insights from PET imaging // *Lancet Psychiatry*. 2015. T. 2. № 8. — C. 743-755.
115. Steenbergen P.J., Richardson M.K., Champagne D.L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study // *Behav Brain Res*. 2011. T. 222. № 1. — C. 15-25.

116. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // *Nature*. 2014. T. 507. № 7490. — C. 62-7.
117. Stewart A.M., Gerlai R., Kalueff A.V. Developing high-throughput zebrafish screens for in-vivo CNS drug discovery // *Front Behav Neurosci*. 2015. T. 9. — C. 14.
118. Stewart A.M., Grieco F., Tegelenbosch R.A., Kyzar E.J., Nguyen M., Kaluyeva A., Song C., Noldus L.P., Kalueff A.V. A novel 3D method of locomotor analysis in adult zebrafish: Implications for automated detection of CNS drug-evoked phenotypes // *J Neurosci Methods*. 2015. T. 255. — C. 66-74.
119. Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) // *Nature*. 1981. T. 291. № 5813. — C. 293-6.
120. Stuart G.W., McMurray J.V., Westerfield M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos // *Development*. 1988. T. 103. № 2. — C. 403-12.
121. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type // *Biochim Biophys Acta*. 1999. T. 1489. № 1. — C. 141-58.
122. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Cell*. 2013. T. 153. № 4. — C. 910-8.
123. Wang Y., Geng L., Yuan M., Wei J., Jin C., Li M., Yu K., Zhang Y., Jin H., Wang E., Chai Z., Fu X., Li X. Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9 // *Plant Cell Rep*. 2017. T. 36. № 8. — C. 1333-1343.
124. Wang Y., Li Z., Xu J., Zeng B., Ling L., You L., Chen Y., Huang Y., Tan A. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori* // *Cell Res*. 2013. T. 23. № 12. — C. 1414-6.
125. Wang Y., Takai R., Yoshioka H., Shirabe K. Characterization and expression of serotonin transporter genes in zebrafish // *Tohoku J Exp Med*. 2006. T. 208. № 3. — C. 267-74.
126. Wiekowski M., Miranda M., DePamphilis M.L. Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei // *Dev Biol*. 1993. T. 159. № 1. — C. 366-78.
127. Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P., Tong X., Zhu Z., Lin S., Zhang B. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish // *Nucleic Acids Res*. 2013. T. 41. № 14. — C. e141.

128. Yu Z., Ren M., Wang Z., Zhang B., Rong Y.S., Jiao R., Gao G. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila* // *Genetics*. 2013. T. 195. № 1. — C. 289-91.
129. Zhang G., Gurtu V., Kain S.R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. T. 227. № 3. — C. 707-11.
130. Zhao X.F., Fjose A., Larsen N., Helvik J.V., Drivenes O. Treatment with small interfering RNA affects the microRNA pathway and causes unspecific defects in zebrafish embryos // *FEBS J*. 2008. T. 275. № 9. — C. 2177-84.